



Universidad de Oviedo

Monografía de conservación y utilización de recursos fitogenéticos de gramíneas pratenses



José Alberto Oliveira Prendes

Departamento de Biología de Organismos y Sistemas

Área de Producción Vegetal

Campus de Mieres

Universidad de Oviedo

INDICE

Prólogo	3
1. Introducción	4
2. Prospección y recolección	5
3. Caracterización y evaluación	7
3.1. Los raigrases o el género <i>Lolium</i>	7
3.1.1. Caracterización agromorfológica de raigrás inglés	8
3.1.2. Diversidad genética en raigrás inglés	9
3.1.3. Interacción genotipo-ambiente en raigrás inglés	13
3.1.4. Colección europea de referencia de raigrás inglés	16
3.1.5. Hongos endofitos en raigrás inglés	17
3.1.6. Diversidad genética en raigrás italiano anual	25
3.1.7. Caracterización de <i>Lolium rigidum</i> Gaud.	27
3.2. Festucas y Poas	29
3.2.1. Festucas altas y hongos endofitos	30
3.2.2. Festucas finas, poas y hongos endofitos	33
4. Gestión de recursos fitogenéticos	40
4.1. Creación de colecciones nucleares	40
4.2. Multiplicación de gramíneas pratenses	48
4.2.1. Introducción	48
4.2.2. Un ciclo de multiplicación en raigrás italiano anual	49
5. Mejora genética de gramíneas pratenses	62
5.1. Mejora genética del raigrás inglés	62
5.1.1. Métodos “ <i>in vivo</i> ” del valor nutritivo de un forraje	63
5.1.2. Ecuaciones de calibración NIRS	64
5.1.3. Primer ciclo de selección en familias	67
5.2. Mejora genética del raigrás italiano	68
5.3. Creación de variedades	68
6. Perspectivas	70
7. Agradecimientos	70
8. Bibliografía citada	71

Prólogo

La conservación y el uso sostenible de los recursos fitogenéticos son esenciales en el desarrollo sostenible de la producción agraria y de las zonas rurales.

La importancia que hoy día tiene la conservación, caracterización y evaluación de estos recursos ha sido puesta de manifiesto estos últimos años mediante la inclusión dentro del Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias del Ministerio de Ciencia y Tecnología, de la Acción Estratégica “Conservación de los recursos genéticos de interés agroalimentario” dirigida a dar respuesta a los retos en este ámbito.

El interés de los profesionales en la conservación y estudio de los recursos fitogenéticos ha crecido mucho en los últimos años. Como resultado, tanto el número de muestras recogidas como el número de bancos de semillas establecidos para conservarlas han aumentado considerablemente.

El trabajo presenta para las gramíneas pratenses más importantes del Norte de España lo que se conoce hasta la fecha de esta publicación, de su diversidad genética (agronómica e isoenzimática) así como los métodos de gestión de esta, haciendo hincapié en el proceso de multiplicación, al ser uno de los procesos en los cuales las muestras de semillas son particularmente vulnerables a la pérdida de diversidad. Se presentan dos ejemplos de valorización de esos recursos mediante la creación de cultivares comerciales en raigrás inglés e italiano, que ilustran como pasar de la teoría a la práctica.

Con la publicación de este documento se espera hacer una aportación útil a las personas interesadas en los recursos fitogenéticos de gramíneas pratenses permitiendo una mejor conservación *ex situ* y utilización de estos.

Mieres, enero de 2006.

José Alberto Oliveira Prendes

1. Introducción

Los recursos fitogenéticos autóctonos del Norte de España están adaptados a su ambiente específico y contienen genes útiles para la mejora y la diversificación de las especies cultivadas de nuestro País. En esta zona, las praderas (naturales y sembradas) son una fuente básica de alimento a bajo coste para la alimentación de los rumiantes. A pesar de la implantación de un sistema de cuotas a la producción láctea, se está produciendo un fenómeno de intensificación de la producción a nivel de explotación ganadera. En muchas explotaciones del Norte de España, el único camino a seguir para aumentar la producción por explotación es el aumento de la producción forrajera por unidad de superficie, para librarse en lo posible de las variaciones en los precios de los concentrados que se compran fuera de las explotaciones.

En Galicia, la superficie de prados naturales y pastizales es de 418.346 has, siendo las de cultivos forrajeros de 273.309 has (maíz forrajero, praderas polifitas y raigrás italiano) (Anuario de Estadística Agraria 2001). En Asturias, la superficie dedicada a prados naturales y pastos es de 310.363 has y la dedicada a cultivos forrajeros de 30.364 has (SADEI, 2002).

De las 6.000 t de semillas de gramíneas pratenses consumidas en España cada año, 5.000 t corresponden a los raigrases (raigrás inglés e italiano) siendo las gramíneas más utilizadas en el Norte de España para la implantación de praderas artificiales (Piñeiro y Pérez, 1992). Casi todas las semillas de gramíneas pratenses consumidas en España se importan, con la excepción del raigrás italiano del que se produce en España algo más de la mitad de la semilla que se consume.

El raigrás italiano es la gramínea más utilizada pues sus altas producciones justifican su utilización en las pequeñas explotaciones del Norte de España. La utilización predominante del raigrás italiano es mediante siega, tanto para la alimentación en verde como para hacer ensilado. El raigrás inglés es una planta ideal para pastoreo y aunque su producción es menor que la del raigrás italiano, su persistencia es mayor. En general en el Norte de España las temperaturas y el período de sequía estival afectan la producción de materia seca, su distribución a lo largo del año y su persistencia. El desarrollo de variedades sintéticas de raigrás teniendo una amplia adaptación y tolerancia a esos factores limitantes, así como una estación de crecimiento amplia, buenos rendimientos y valor nutritivo, son objetivos importantes en la mejora genética de estas especies.

Además de estos usos tradicionales, estas especies proporcionan muchas posibilidades para la extensificación, la diversificación y la protección del medio ambiente. La estabilización de taludes en autopistas, vías férreas, cauces hidráulicos, la cubrición de vertederos y bocas de mina, la revegetación de espacios naturales deteriorados, etc., son posibles aplicaciones de la utilización de gramíneas para usos no forrajeros. En Galicia y en el caso concreto de las gramíneas forrajeras, se mantienen bancos de germoplasma en la Misión Biológica de Galicia (MBG) dependiente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (Lindner y García, 1997; Ron *et al.*, 1997), y en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM), dependiente de la Consellería de Política Agroalimentaria e Desenvolvemento Rural (Oliveira, 2000). La MBG conserva unas 500 muestras de dactilo (*Dactylis glomerata* L.) y el CIAM unas 140 muestras de raigrases y festucas (*Lolium perenne* L., *Lolium multiflorum* Lam. y *Festuca arundinacea* Schreb.), las cuales han sido recientemente evaluadas agrónomicamente (López y Oliveira, 2002). Esta colección se completó durante los años 1999 y 2000 con nuevas recolecciones de gramíneas poco representadas en el banco del CIAM (Oliveira *et al.*, 2001), entre las que destacan géneros como *Agrostis*, *Poa*, y festucas finas (festucas rojas o rubras y ovinas), en virtud de la financiación aportada por el proyecto “Recolección, multiplicación y caracterización de recursos fitogenéticos de gramíneas de la Cordillera Cantábrica” (RF99-018) y financiado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación dentro del programa de conservación y utilización de recursos fitogenéticos, con una duración de cuatro años (1999-2002).

2. Prospección y recolección

Con el fin de comenzar programas de mejora genética en el raigrás inglés e italiano, se realizó una primera prospección y recolección de poblaciones naturales de gramíneas pratenses, particularmente raigrás inglés e italiano en Galicia en 1985 bajo el patrocinio de la Xunta de Galicia. Con el fin de aumentar la variabilidad genética en el programa de mejora se realizó una prospección de gramíneas pratenses por la zona costera del Norte de España desde Galicia hasta el País Vasco. Posteriormente se realizaron prospecciones y recolecciones particulares de otras especies del género *Lolium* en Canarias (1991) y en Sierra Nevada (1992) gracias al apoyo de dos Acciones Integradas Hispanofrancesas en colaboración con la Station d'Amelioration des Plantes de Clermont-Ferrand y de *Festuca arundinacea* en 1993

con la Universidad norteamericana de Columbia-Missouri. Además, la participación en la evaluación (1995-1998) de una colección de referencia (core collection) europea de raigrás inglés ha permitido disponer de 152 poblaciones de 15 países europeos con el fin de obtener recursos fitogenéticos útiles en la mejora del raigrás inglés de Galicia.



Figura 1. Recolección de semillas de *Festuca* en Galicia (1993).

En 1995, se realizó el inventario de las muestras de gramíneas pratenses españoles presentes en el Banco de semillas del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM), encontrándose 141 muestras viables (que germinan). De esas muestras, 74 son de raigrás inglés, 43 de raigrás italiano y 24 de festuca alta.

Durante los años 1999 y 2000 se recogieron en la Cordillera Cantábrica 203 muestras de diferentes especies de gramíneas, de las cuales 67 son del género *Dactylis*, 33 del género *Poa*, 28 festucas finas (*Festuca rubra*, *Festuca* grupo *ovina*, etc.), 23 del género *Agrostis*, 22 del género *Lolium* y el resto, de especies pratenses de menor importancia (*Brachypodium*, *Arrhenatherum*, etc.).

De una manera general, para todas las poblaciones, se rellenó una ficha de prospección en cada lugar de recolección con el objetivo de disponer de los datos de pasaporte (localización y características de los lugares de recolección). Con posterioridad, se obtuvieron los datos climáticos de los lugares de recolección a partir de las estaciones meteorológicas más cercanas. En el caso de las poblaciones de raigrás inglés gallegas se

tomaron muestras de suelo en cada lugar de recogida, que posteriormente se analizaron en laboratorio.

Las recolecciones se hicieron en forma de semilla, sobre al menos 50 plantas distribuidas sobre una superficie inferior a 1000 m². Este método de recolección permite asegurar una buena representatividad de las características originales de la población (Tyler *et al.*, 1984). Las semillas de todas las plantas se mezclaron en conjunto sin ponderar de acuerdo con la cantidad de semillas aportada por cada planta. En el caso de las variedades locales de raigrás italiano anual la semilla procede de semilla suministrada por agricultores o por Oficinas Comarcales de Extensión Agraria. Las semillas se conservan en cámara frigorífica en envases herméticos entre 0-4 °C y 45-50% humedad relativa. Se creó una base de datos en Acces y se envió una copia a la base europea de *Lolium* y *Festuca* y al Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos del INIA.



Figura 2. Botes herméticos con semillas de raigrás inglés dentro de una cámara frigorífica del CIAM.

3. Caracterización y evaluación

3.1. Los raigrases o el género *Lolium*

El género *Lolium* pertenece a la familia de las Gramíneas (*Poaceae*), tribu *Festuceae*, y comprende únicamente especies diploides con $2n = 14$ cromosomas. No se encuentran poliploides en estado silvestre como ocurre en muchos géneros de Gramíneas (*Festuca*, *Dactylis*, *Briza*, *Avena*, etc.).

El raigrás italiano (*Lolium multiflorum* Lam.) y el raigrás inglés (*Lolium perenne* L.) son las especies más utilizadas en las zonas templadas (Europa y Nueva Zelanda), la primera aprovechada sobre todo mediante siega (ensilado y aprovechamiento en verde), la segunda sobre todo en pastoreo y como césped.

Lolium rigidum es una gramínea forrajera espontánea, conocida como mala hierba de los cereales. Se cultiva también en zonas de clima mediterráneo, principalmente en el sur de Australia e Italia para pastoreo invernal.

3.1.1. Caracterización agromorfológica de raigrás inglés

En 47 poblaciones naturales de raigrás inglés recogidas en Galicia se encontró una gran variabilidad agronómica, aunque presentaron peores características agronómicas (producción de materia seca, tolerancia a enfermedades, etc.) que las variedades testigos (Oliveira y Charmet, 1988a). Las poblaciones que mostraron un crecimiento más importante provienen de zonas de baja altitud, con pluviometría elevada y temperaturas medias del mes más frío suaves. Las poblaciones más tolerantes a enfermedades se recogieron en lugares con un déficit de precipitación moderado y en suelos con un contenido bajo en calcio (Arbones y Oliveira, 1995).



Figura 3. Espigas de raigrás inglés (*Lolium perenne* L.).

Las principales enfermedades evaluadas fueron la roya negra (*Puccinia graminis* Pers.) y coronada (*Puccinia coronata* Corda), el oidio (*Erysiphe graminis* DC., el *Rhynchosporium* spp., y el *Helminthosporium* o *Drechslera* spp. Los momentos de mayor presión de enfermedades coincidieron todos los años con los fines de primavera y principios de verano, y finales del otoño. En verano los ataques son elevados, pero en esa época hay una parada de crecimiento sin producción de forraje por lo que los daños no son importantes (Oliveira *et al.*, 1996).

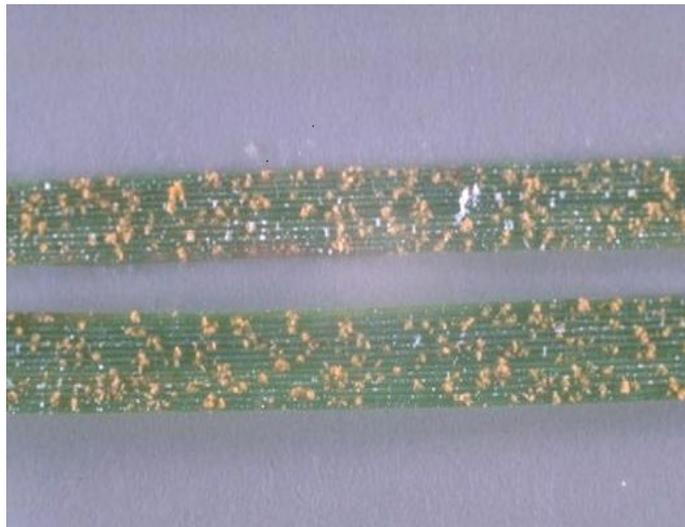


Figura 4. Enfermedad foliar de gramíneas pratenses (*Puccinia coronata*).

3.1.2. Diversidad genética en raigrás inglés

La base genética del material recogido en Galicia se amplió posteriormente mediante nuevas recogidas siguiendo un gradiente latitudinal y longitudinal desde la costa atlántica gallega al Norte de Francia. Los resultados de la evaluación de 58 poblaciones de raigrás inglés se publicaron por Oliveira *et al.* (1997a) y Balfourier *et al.* (1997).

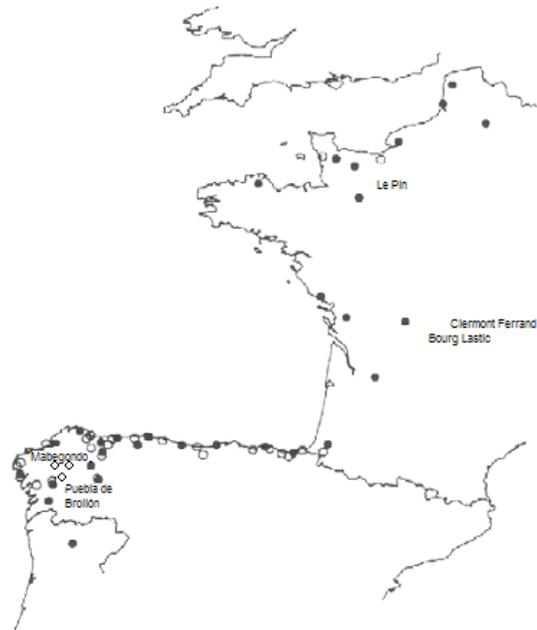


Figura 5. Mapa de la localización de las 58 poblaciones y los cinco lugares de evaluación. Los puntos en negro son las 28 poblaciones muestreadas para el estudio de electroforesis.

En 28 poblaciones de las 58 evaluadas agrónomicamente se evaluó la diversidad isoenzimática mediante 10 loci polimórficos (PGI2, ACP2, GOT2, GOT3, SOD1, PRX1, IDH1, SKD1, PGM1 y MDH1) para conocer ciertos parámetros genéticos como el número de alelos/locus y las heterocigidades.

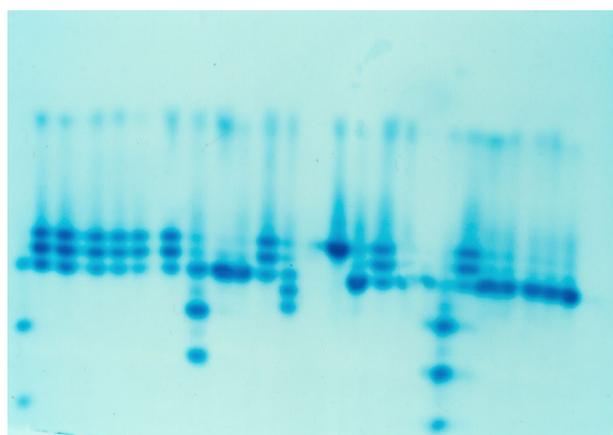


Figura 6. Locus PGI2.

Las estadísticas de genética de poblaciones que se obtuvieron fueron de la misma magnitud a las obtenidas previamente por otros autores en especies de fecundación cruzada (n° de alelos por locus = 2,82, heterocigosis observada = 0,289 y heterocigosis esperada = 0,312). La diferenciación entre las poblaciones (7,9% de la diversidad total) se explicó parcialmente por la latitud y la altitud de los lugares de recogida mediante un método de regresión logística aplicado para ver las relaciones entre las frecuencias alélicas y algunas variables explicativas (altitud, latitud y longitud del lugar de recogida de las poblaciones). La regresión logística se usa a menudo para investigar las relaciones entre variables binarias y ordinales con variables explicativas (Collet, 1991). De esta manera, se observó un clin sur-norte para los alelos ACP2-20 (antes ACP2-a) y PGI2-20 (antes PGI2-a), encontrándose las frecuencias mayores en las zonas de recolección más al Norte. De la misma manera, en las poblaciones provenientes de zonas de mayor altitud se encontraron más alelos SKD1-30 (antes SKD1-b) y PGI2-20.

La mayoría de los alelos no muestran una estructuración geográfica. Como señala Sokal (1986), esto se puede explicar por una situación muy cercana a la panmíxia en toda la zona geográfica de estudio. Esto se debería a un gran flujo genético entre las poblaciones debido al transporte de semillas por animales o incluso al transporte de polen por el viento. Sin embargo, algunos alelos mostraron una variación clinal en las frecuencias alélicas, como ocurre con ACP2-20 y PGI2-20, que son más frecuentes en el Norte que en el Sur. Hay dos hipótesis que tratan de explicar estas variaciones clinales: una de ellas es la hipótesis de la selección de diferentes alelos a lo largo de un gradiente geográfico o ecológico (Endler, 1977), la otra, propone que sea consecuencia de la migración y de la dispersión a lo largo de un eje geográfico (Wijsmann y Cavalli-Sforza, 1984). Loos (1994) también indicó la existencia de un clin Norte-Sur para diferentes alelos en una colección europea de poblaciones de raigrás inglés desde Inglaterra a Italia. Este autor está más de acuerdo con la hipótesis de la migración. Sin embargo, es difícil establecer conclusiones sobre el origen de esta estructuración, ya que en el caso de la relación entre los alelos PGI2-20 y ACP2-20 con la latitud, si consideramos la hipótesis de la migración, debería haberse observado un clin similar para todos los loci (Barbujani, 1988). Para estar de acuerdo con la hipótesis de la selección, hubiese sido necesario muestrear poblaciones en varios y distintos gradientes climáticos y geográficos como hizo Lumaret (1984) en *Dactylis glomerata* L.

También observamos que el alelo PGI2-20 parece relacionado con la altitud. Esto se podría explicar, probablemente, por la hipótesis de la selección. En este sentido, Humphreys (1992) observó una asociación consistente entre el contenido en carbohidratos solubles y el locus PGI2. Este locus está implicado en el aumento de carbohidratos solubles, produciendo un aumento del efecto osmótico responsable de una mejor tolerancia al frío. En estas condiciones, es posible imaginar que la altitud del lugar de recolección (y consecuentemente bajas temperaturas) interactúa con la reacción enzimática y actúa como una presión de selección (Balfourier *et al.*, 1997). En el caso de la relación del alelo SKD1-30 con la altitud, si consideramos la teoría neutralista, se puede suponer que este locus está muy ligado con un locus de un carácter cuantitativo, que puede ser seleccionado por la altitud.

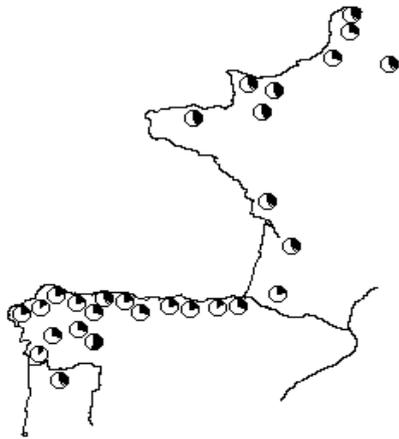


Figura 7. Distribución geográfica del alelo PGI2-20 (antes PGI2-a) en 28 poblaciones de raigrás inglés. Los sectores en negro son proporcionales a las frecuencias alélicas.

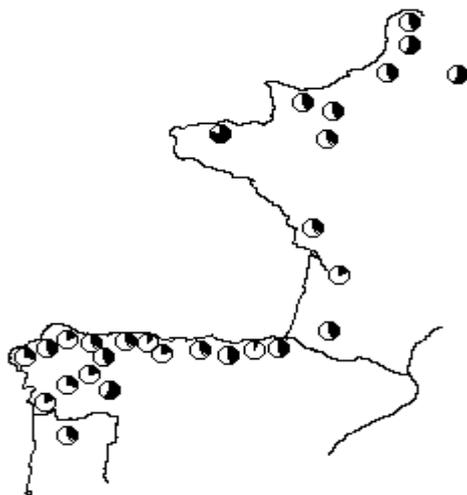


Figura 8. Distribución geográfica del alelo ACP2-20 (antes ACP2-a) en 28 poblaciones de raigrás inglés. Los sectores en negro son proporcionales a las frecuencias alélicas.

3.1.3. Interacción genotipo-ambiente en raigrás inglés

El crecimiento estacional es un factor clave en los programas de mejora que buscan ampliar la adaptación del raigrás inglés. Dicho crecimiento en gramíneas es probablemente el resultado de la acción de muchos genes que interactúan con el ambiente, pero la constitución genética de estas poblaciones está influida también por las condiciones climáticas del lugar de origen de estas, actuando como una presión de selección.

Sobre una muestra de 58 poblaciones naturales del Norte de España y Francia se realizó un estudio agronómico en cinco localidades (tres en Francia y dos en España). Esta muestra de poblaciones presentó interacciones genotipo-ambiente muy significativas para los caracteres de crecimiento estacional (crecimiento de otoño, invierno y primavera).

Con el fin de explicar esas interacciones se utilizó un método de regresión con covariables asociadas tanto a los ambientes como a los genotipos, llamado regresión factorial (Denis, 1988). Este método utiliza varios términos multiplicativos, es decir, el producto de covariables, dos por dos, tanto covariables de las localidades de evaluación como de las poblaciones. Como covariables ambientales, se utilizaron los datos climáticos de los lugares de evaluación. Como covariables genéticas, las frecuencias alélicas de las poblaciones y los datos climáticos de los lugares de origen de las poblaciones. Aunque, la variación isoenzimática se considera en general, selectivamente neutra (Kimura, 1983), se han encontrado algunos alelos correlacionados con factores ambientales (Nevo *et al.*, 1988). En este trabajo, cuando se encontró que algún alelo explicó una parte de las interacciones genotipo-ambiente, se propusieron algunas interpretaciones genéticas.

Un análisis de regresión factorial utilizando estas covariables permitió explicar la mayoría de esas interacciones mediante el producto de dos covariables (Balfourier *et al.*, 1997).

Una manera útil de presentar los coeficientes de regresión del efecto población es situándolos en un mapa para la temperatura mínima de las localidades de evaluación (crecimientos de primavera e invierno) y para la temperatura media de la localidad de evaluación (crecimiento de otoño). Las figuras siguientes nos permiten situar las poblaciones

que se espera tengan una interacción positiva (o negativa) en los lugares de evaluación más cálidos o fríos en invierno (círculos negros o blancos) o en los lugares más cálidos o más fríos anualmente (círculos negros o blancos).

En el caso del crecimiento de primavera el 72,8% de la interacción se explicó mediante dos covariables: la frecuencia de alelo PGI2-20 de las poblaciones y la temperatura mínima del mes más frío de los lugares de evaluación (las poblaciones con frecuencias altas de PGI2-20 evaluadas en localidades más frías son en media más vigorosas en primavera). El alelo PGI2-20 codifica para enzimas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos con lo que se puede pensar que influye en el incremento del contenido de carbohidratos produciendo un efecto osmótico responsable de una mayor tolerancia al frío e influyendo en el crecimiento de las plantas. La t^a mínima del lugar de evaluación interactuaría con la reacción enzimática, siendo una presión de selección. Ese efecto no se mostró en Mabegondo ni en Puebla por sus temperaturas altas. La mayoría de las poblaciones españolas tuvieron coeficientes de regresión positivos (círculos negros) lo que conduce a una interacción positiva en los lugares de evaluación con temperaturas mínimas de invierno altas (localidades gallegas). De la misma manera, la mayoría de las poblaciones francesas tuvieron coeficientes negativos (círculos blancos) y por lo tanto tendrán interacciones positivas cuando se evalúen en las localidades con las temperaturas mínimas más bajas (localidades francesas).



Figura 9. Mapa de los coeficientes de regresión del carácter vigor de primavera, sobre la covariable temperatura mínima de la localidad de evaluación. El tamaño del símbolo es proporcional al valor absoluto del coeficiente de regresión. Los símbolos en blanco representan coeficientes negativos y los negros positivos.

En el caso del vigor de otoño se observan diferentes modos de comportamiento de las poblaciones. Algunas poblaciones de Galicia y Asturias en España o de la Bretaña y Normandía en Francia (círculos blancos) muestran interacciones positivas cuando se evalúan en localidades frías como Bourg-Lastic en Francia. En otras poblaciones de España y Francia se observan interacciones positivas (círculos negros) cuando se evalúan en las localidades más cálidas (Mabegondo y Puebla de Brollón).

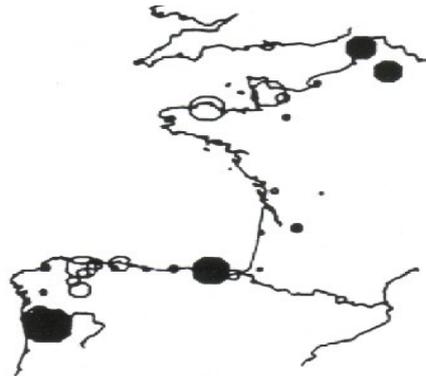


Figura 10. Mapa de los coeficientes de regresión del carácter vigor de otoño sobre la covariable temperatura media de la localidad de evaluación. El tamaño del símbolo es proporcional al valor absoluto del coeficiente de regresión. Los símbolos en blanco representan coeficientes negativos y los negros positivos.

Finalmente, en el vigor de invierno se observó algo similar al vigor de primavera: las poblaciones españolas mostraron una interacción positiva en las localidades de evaluación más cálidas (localidades españolas) excepto algunas poblaciones de Galicia y Asturias que parecen adaptarse bien a los inviernos franceses.

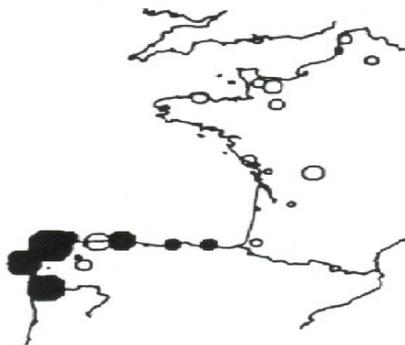


Figura 11. Mapa de los coeficientes de regresión del carácter vigor de invierno, sobre la covariable temperatura mínima de la localidad de evaluación. El tamaño del símbolo es proporcional al valor absoluto del coeficiente de regresión. Los símbolos en blanco representan coeficientes negativos y los negros positivos.

Las poblaciones procedentes de lugares con una suma de temperaturas de invierno (suma de temperaturas positivas desde el 1 de enero al 31 de marzo) más alta mostraron un crecimiento de invierno mayor en las localidades de evaluación con inviernos cálidos (Mabegondo y Puebla). Por otra parte, las poblaciones francesas procedentes de lugares con inviernos fríos dan mejores resultados en lugares de evaluación fríos.

Para los crecimientos de primavera y de invierno se puede decir que las poblaciones procedentes de lugares con inviernos fríos muestran una interacción positiva en lugares de evaluación fríos y viceversa con los cálidos. Una posible causa de esto es la selección natural.

En relación con el crecimiento de otoño, la interacción se explicó sobre todo por la temperatura media del lugar de evaluación y por la frecuencia del alelo SOD1-30. Una frecuencia alta del alelo SOD1-30 parece favorable al crecimiento de otoño de las poblaciones evaluadas en localidades con temperaturas medias altas como Puebla.

3.1.4. Colección europea de referencia de raigrás inglés

Con el fin de encontrar recursos fitogenéticos adaptados a Galicia, se evaluaron 152 poblaciones naturales de raigrás inglés de 15 países europeos, en condiciones de bajo mantenimiento dentro del “Forages Network del ECP/GR (European Cooperative Programme for Crop Genetic Resources Network)”. Se consideró la producción estacional y anual de materia seca, fecha de espigado, hábito de crecimiento e incidencia de enfermedades foliares en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (A Coruña) durante 1997 y 1998. Las poblaciones de Italia y Bélgica mostraron la mayor variabilidad y el mejor comportamiento agronómico para estos caracteres. Las poblaciones procedentes de la República Checa y de Holanda presentaron un buen comportamiento agronómico general con algunos aspectos negativos, como la baja producción de materia seca otoñal y la sensibilidad a enfermedades. Las poblaciones más precoces de espigado fueron las de Italia (fecha media de espigado el 25 de abril) y las más tardías las de la República Checa (fecha media de espigado el 29 de mayo). Las poblaciones de Holanda y Bélgica tuvieron fechas de espigado intermedias (del 10 al 13 de mayo). De acuerdo con estos resultados, en los programas de mejora genética de raigrás inglés para Galicia, que deseen introducir material exótico con

buen valor agronómico y gran variabilidad genética, se recomienda usar los recursos fitogenéticos procedentes de Italia y Bélgica (Oliveira y González, 2000).

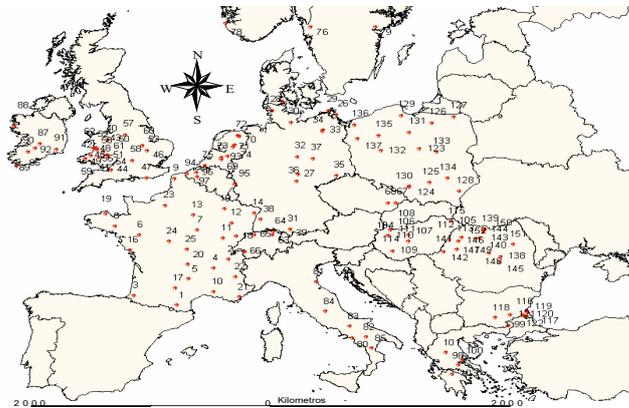


Figura 12. Países de origen de las 152 poblaciones europeas de raigrás inglés.

3.1.5. Hongos endófitos en raigrás inglés

El raigrás inglés (*Lolium perenne* L.) puede albergar hongos endófitos que pertenecen a los géneros *Epichloë* y *Neotyphodium* (antiguamente denominado *Acremonium*) (Christensen *et al.*, 1993; Schardl, 1996). Las plantas de raigrás inglés infectadas por *Neotyphodium* (Glenn *et al.*, 1996) no presentan ningún síntoma y el hongo se transmite verticalmente por semilla (Neil, 1941). El hongo endofítico *Epichloë typhina* (White, 1987) en *Lolium* desarrolla un collar de micelio fúngico en el espigado de la planta, lo que impide la emergencia de la espiga, esterilizando la planta.



Figura 13. Hongo endofito *Epichloë typhina* en dactilo.

La relación entre el hongo y la planta se considera mutualística (Clay, 1988). Por otra parte, la infección con el hongo se ha mostrado que aumenta el valor adaptativo de la planta debido a una mayor tolerancia a la sequía (West *et al.*, 1993), a insectos y nematodos (Latch, 1993). Los efectos del endofito, tanto en el comportamiento de la planta como en la producción animal, están influidos por una serie de metabolitos secundarios incluyendo diferentes alcaloides tóxicos producidos por la interacción planta-hongo. Christensen *et al.* (1993) mostraron una gran variabilidad en la naturaleza y producción de estos metabolitos secundarios por diferentes cepas de endofitos.

La parálisis del raigrás (“ryegrass staggers”) es una intoxicación del ganado, especialmente en Nueva Zelanda, debida a la presencia de *Neotyphodium lolii* en las plantas de raigrás consumidas. Esta enfermedad está causada por el lolitreño B, una neurotoxina sintetizada por el endofito en raigrás inglés (Fletcher *et al.*, 1993). Este síndrome está caracterizado por una función neuromuscular reducida, temblores en el cuello y miembros, ganancias de peso reducidas y problemas reproductivos debidos a niveles de la hormona prolactina bajos (Thompson y Stuedmann, 1993; Valentine *et al.*, 1993). Recientemente se han descrito casos de esta intoxicación en ovejas, ganado vacuno y caballos en Alemania, Holanda y el Reino Unido (Lewis, 1997).

Los alcaloides ergopeptínicos se producen también en raigrás inglés infectado por hongos endofitos (Rowan y Shaw, 1987). De estos compuestos, la ergovalina está reconocida como el más importante en el raigrás. Este alcaloide tiene efectos complejos en los animales en pastoreo entre los que la vasoconstricción y el aumento de temperatura corporal son los más claros. Otros efectos incluyen una disminución de la ganancia de peso y problemas reproductivos. Este conjunto de síntomas se denomina “festucosis” por haberse detectado primero en ganado pastando plantas de festuca infectadas por hongos endofitos. En la actualidad, se sospecha que hay una interacción de los efectos de la ergovalina y el lolitreño B en el agravamiento del “ryegrass staggers” (Fletcher, 1999). Este síndrome se ha descrito esporádicamente en Francia (Bony *et al.*, 1996) en novillas pastando praderas viejas de festuca alta.

Los alcaloides lolitreño B y ergovalina están concentrados en los 20-40 mm del pasto más cercanos al suelo, notablemente en las vainas foliares más viejas y también en los tallos y espigas, aumentando mucho su concentración con temperaturas ambientes y humedades

relativas altas y en el momento de producción de semillas por parte de la planta (Hamilton-Manns y Crothers, 1999).

En España, como en otros países europeos, la infección en poblaciones naturales de raigrás inglés con el hongo endofito es amplia y común (Lewis *et al.*, 1997; Plaza *et al.*, 2001). En un muestreo realizado sobre 54 poblaciones de raigrás inglés del Norte de España, Oliveira y Castro (1998) observaron que el 72% de las poblaciones contenían hongos endofitos. Los porcentajes de infección fueron generalmente inferiores al 50% y raramente extremos. Los valores superiores al 50% se encontraron principalmente en las poblaciones recogidas en las localidades más cálidas y secas.



Figura 14. Niveles de infección en 54 poblaciones naturales españolas de raigrás inglés: el tamaño del símbolo es proporcional al nivel de infección.

A pesar de ello, en Europa, la información sobre la producción de alcaloides en raigrás inglés es escasa. Oldenburg (1997) encontró una variación estacional en lolitreno B en hierba de ecotipos alemanes de raigrás inglés infectados, desde 1993 a 1996. Los valores más altos, 0,8 a 1,4 ppm se obtuvieron durante los meses de julio y agosto. En España, Oliveira *et al.* (1997c, 2000b) encontraron valores bajos de ergovalina en hierba de material de mejora de raigrás inglés en el invierno y valores medios de 1,6 ppm de lolitreno B y de 5,9 ppm de ergovalina en semillas de poblaciones de raigrás inglés multiplicadas en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo.

Oliveira *et al.* (2002) analizaron el contenido en los alcaloides lolitreno B y ergovalina en semillas de 21 poblaciones naturales de raigrás inglés (*Lolium perenne* L.) del norte de España, infectadas con los hongos endofitos *Neotyphodium*.

Tabla 1. Origen, altitud y tipo de hábitat de las muestras de semillas de raigrás inglés recogidas en el norte de España.

Código	Origen	Altitud (m)	Hábitat
1	Argelaguer (Girona)	150	Prado
2	Seo de Urgel (Lleida)	700	Terreno inculto
3	Ariniz (Vitoria)	500	Camino
4	Grado (Asturias)	60	Borde carretera
5	Teverga (Asturias)	600	Camino
6	Barrios de Luna (León)	1100	Borde carretera
7	Barrios de Luna (León)	1100	Prado
8	Sena de Luna (León)	1100	Camino
9	Pobladura de Luna (León)	1150	Camino
10	Rabanal de Luna (León)	1150	Camino
11	La Magdalena (León)	1150	Borde carretera
12	Ponferrada (León)	400	Camino
13	Cariño (A Coruña)	20	Terreno inculto
14	El Ventorrillo (A Coruña)	100	Terreno inculto
15	Ronda de Nelle (A Coruña)	30	Terreno inculto
16	Louro (A Coruña)	40	Terreno inculto
17	Canabal (Lugo)	400	Terreno inculto
18	Rodicio (Ourense)	950	Terreno inculto
19	Ribadumia (Pontevedra)	30	Camino
20	Ponte-Caldelas (Pontevedra)	500	Terreno inculto
21	La Lanzada (Pontevedra)	20	Terreno inculto

El nivel de infección medio fue de 40,1%, variando desde el 8 al 80%, estando el 62% de las poblaciones por debajo del nivel del 50% de infección. El contenido medio del alcaloide lolitreno B fue de 1,1 ppm variando de 0,0 a 7,1 ppm, mientras que el contenido medio del alcaloide ergovalina fue de 13,5 ppm variando de 1,0 a 36,2 ppm.

Tabla 2. Porcentajes de infección del hongo endofito *Neotyphodium* y contenidos en los alcaloides lolitreno B y ergovalina (ppm = miligramos del alcaloide / kilogramos de peso seco de semilla) en muestras de semillas de raigrás inglés recogidas en 21 zonas del norte de España.

Código	Porcentaje de infección	Lolitreno B (ppm)	Ergovalina (ppm)
1	51	2,2	2,2
2	10	0,5	1,0
3	72	1,9	7,0
4	20	0,0	4,0
5	12	0,0	2,1
6	40	3,9	6,0
7	42	0,0	36,2
8	18	0,0	6,8
9	39	2,6	19,8
10	41	2,4	13,6
11	72	7,1	8,0
12	78	0,0	11,0
13	30	0,0	32,8
14	21	1,9	5,8
15	80	0,4	35,8
16	52	0,0	26,9
17	15	0,0	4,0
18	8	0,0	2,2
19	21	0,2	14,0
20	59	0,0	13,3
21	62	0,0	31,7
Media	40,1	1,1	13,5
Desviación estándar	23,7	1,8	12,0

Se estudiaron las relaciones entre el nivel de infección y el contenido en alcaloides mediante las correlaciones de Spearman. Se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre el porcentaje de infección y el contenido en ergovalina ($r = 0,59$) a un nivel de significación del 1%. Las concentraciones más altas de lolitreno B y de ergovalina se consideran suficientes para inducir los síndromes del “ryegrass staggers” y la “festucosis”, pero debido a la diversidad de especies pratenses en los prados naturales del norte de España es poco probable que aparezcan estos desórdenes. Sin embargo, en pastos con gran abundancia de raigrás inglés infectado con hongos endofitos, sería conveniente evitar que el ganado pastase las plantas espigadas, debido a que es en las semillas donde las concentraciones de alcaloides son más altas.

En un estudio realizado por Oliveira *et al.* (2003) se sugiere la posibilidad de desarrollar asociaciones raigrás inglés-hongos endofitos sin la presencia del alcaloide lolitreno B y que no acumulen cantidades excesivas del alcaloide ergovalina a partir de poblaciones naturales de raigrás inglés de Galicia. En este trabajo se determinaron las

concentraciones de ergovalina en dos genotipos (EI19 y EI24) infectados con un hongo endofito nativo que no produce lolitreno B, durante tres años en dos localidades de Galicia (Mabegondo en A Coruña y Puebla de Brollón en Lugo). Se observó un efecto significativo ($P < 0,05$) en la fecha de muestreo durante los tres años y en las dos localidades de estudio.

Las concentraciones medias de ergovalina variaron de 0,06 ppm en el comienzo de la primavera a 0,57 ppm en junio. El genotipo EI19 presentó concentraciones de ergovalina significativamente más altas (0,37 ppm, SE = 0,09) que el EI24 (0,33 ppm, SE = 0,08) sólo en una localidad y en el año 2000. En las condiciones del Noroeste español, los valores de ergovalina obtenidos en este trabajo fueron lo suficientemente altos como para alcanzar niveles potencialmente tóxicos para los animales.

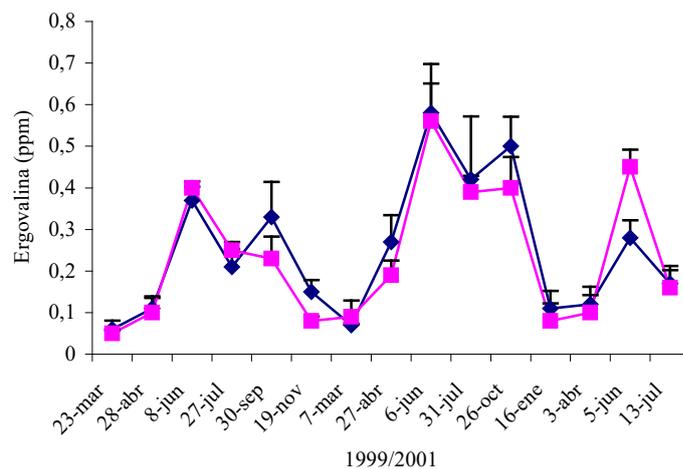


Figura 15. Concentración de ergovalina (ppm) en dos genotipos de raigrás inglés (EI19, círculos y EI24, cuadrados) infectados con una cepa de hongo endofito evaluados en Mabegondo (A Coruña). Las barras verticales representan desviaciones estándar entre réplicas de un genotipo.

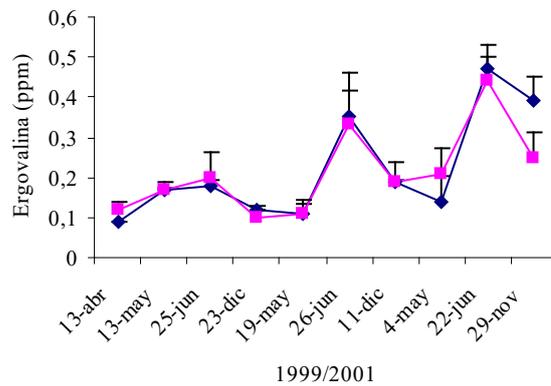


Figura 16. Concentración de ergovalina (ppm) en dos genotipos de raigrás inglés (EI19, círculos y EI24, cuadrados) infectados con una cepa de hongo endofito evaluados en Puebla de Brollón (Lugo). Las barras verticales representan desviaciones estándar entre réplicas de un genotipo.

Con el objetivo de determinar el efecto de la infección con los hongos endofitos en la producción de materia seca, valor nutritivo y persistencia del raigrás inglés en Galicia, Oliveira *et al.* (2004) realizaron un ensayo con los dos genotipos de raigrás inglés anteriores (EI19 y EI24) y los mismos genotipos desprovistos del hongo endosito. Este estudio se realizó durante un periodo de cuatro años y en las dos localidades gallegas indicadas en el anterior trabajo.



Figura 17. Parcelas de ensayo con genotipos de raigrás inglés infectado y no infectado.

El hongo endofito no influyó en la producción de materia seca ni en la persistencia de los dos genotipos de raigrás inglés estudiados. La falta de un nivel de estrés adecuado podría explicar estos resultados. El valor nutritivo de las plantas tampoco resultó influido por la infección con el hongo endofito, excepto en el caso de la digestibilidad de la materia orgánica y el contenido en carbohidratos solubles en alguna ocasión ($P < 0,05$). El valor medio de la digestibilidad de la materia orgánica (dos comparaciones significativas de ocho) fue ligeramente superior en los genotipos infectados (72,4 y 83,4%) que en los genotipos no infectados (70,3 y 82,6%). El contenido medio en carbohidratos solubles (dos comparaciones de ocho) fue también más alto en los genotipos infectados (18,5 y 26,3%) que en los genotipos libres del hongo (17,3 y 24,6%). Estas diferencias fueron pequeñas y no permiten recomendar el uso de variedades infectadas con los hongos endofitos con vistas a la producción de forraje en las localidades de estudio debido a los pequeños efectos positivos obtenidos y a los posibles efectos negativos en las producciones animales por la presencia del alcaloide ergovalina.

Tabla 3. Producción de materia seca anual (MS en t ha⁻¹), valores medios de valor nutritivo (NIRS-CP = proteína bruta predicha NIRS en % MS, NIRS-WSC = carbohidratos solubles predichos NIRS en % MS, NIRS-DOM = digestibilidad de la materia orgánica predicha NIRS en % de materia orgánica) de dos genotipos de raigrás inglés infectados (EI) y los mismos genotipos libres de endofitos (EF) en Mabegondo (A Coruña). Medias seguidas de diferentes letras en la columna fueron significativamente diferentes al nivel de 0,05 de acuerdo con el test T de Bonferroni. SE es el error estándar de la media.

Año	Endofito	MS	NIRS-CP	NIRS-WSC	NIRS-DOM
1999	EI	13,9	14,5	17,7	74,9
	EF	13,6	14,7	17,4	74,9
	SE	0,38	0,15	0,28	0,24
2000	EI	12,3	16,0	16,6	75,4
	EF	11,9	15,9	16,2	75,1
	SE	0,31	0,22	0,14	0,17
2001	EI	11,4	13,0	20,8	76,9
	EF	10,6	13,5	20,1	74,7
	SE	0,23	0,22	0,57	0,72
2002	EI	9,8	15,8	18,5a	72,4a
	EF	9,4	15,8	17,3b	70,3b
	SE	0,30	0,07	0,24	0,23

Tabla 4. Producción de materia seca anual (MS en t ha⁻¹), valores medios de valor nutritivo (NIRS-CP = proteína bruta predicha NIRS en % MS, NIRS-WSC = carbohidratos solubles predichos NIRS en % MS, NIRS-DOM = digestibilidad de la materia orgánica predicha NIRS en % de materia orgánica) de dos genotipos de raigrás inglés infectados (EI) y los mismos genotipos libres de endofitos (EF) en Puebla de Brollón (Lugo). Medias seguidas de diferentes letras en la columna fueron significativamente diferentes al nivel de 0,05 de acuerdo con el test T de Bonferroni. SE es el error estándar de la media.

Año	Endofito	MS	NIRS-CP	NIRS-WSC	NIRS-DOM
1999	EI	12,9	13,1	26,3a	85,6
	EF	13,2	13,5	24,6b	84,9
	SE	0,18	0,18	0,42	0,21
2000	EI	5,6	10,5	24,3	80,9
	EF	5,0	10,7	24,2	80,4
	SE	0,25	0,12	0,41	0,27
2001	EI	8,8	14,0	21,5	83,4a
	EF	8,7	14,1	21,7	82,6b
	SE	0,24	0,31	0,47	4,44
2002	EI	7,7	15,9	15,1	76,5
	EF	7,6	15,6	15,4	76,4
	SE	0,27	0,22	0,42	0,31

3.1.6. Diversidad genética en raigrás italiano anual

Oliveira *et al.* (1997b) evaluaron la variabilidad agronómica, morfológica e isoenzimática en 16 variedades locales de raigrás italiano anual de Galicia y Asturias en tres localidades: Mabegondo (La Coruña), Puebla de Brollón (Lugo) y Salcedo (Pontevedra).

Las variedades locales mostraron una gran diversidad morfológica, agronómica e isoenzimática. Mediante métodos de análisis estadísticos multivariados se identificaron cuatro grupos de variedades.

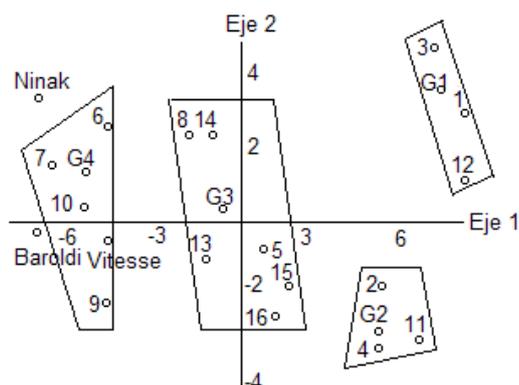


Figura 18. Proyección de 16 variedades locales de raigrás italiano anual (1-16) y tres testigos comerciales (Ninak, Baroldi y Vitesse) en el plano 1-2 del análisis de componentes principales obtenido sobre una matriz de correlaciones (varianza acumulada = 65,9%) en base a caracteres agromorfológicos.

El grupo 1, incluye las variedades más precoces de espigado (fecha media de espigado, primera semana de marzo) que presenta poco interés agronómico, el grupo 2 comprende las variedades que espigan en la tercera semana de marzo y con una alta producción de invierno. Las variedades de este grupo proceden del Sudoeste de Galicia. El grupo 3 incluye variedades de fechas de espigado intermedias (primera semana de abril), y proceden de Asturias y La Coruña. El último grupo incluye las variedades más tardías de espigado (en el mes de abril) y con un buen rendimiento de primavera. Todas las poblaciones de este grupo proceden de La Coruña.

El análisis de nueve loci polimórficos en 100 plantas por población (PGI2, ACP2, IDH1, PGM1, PRX1, SKD1, GOT2, GOT3 y SOD1) permitió comprobar que los principales índices de diversidad (n° medio de alelos por locus = 3,59 y heterocigosidad esperada media = 0,510) fueron mayores que los reseñados por Hamrick y Godt (1990) para especies alogamas con polinización anemófila. Los índices de diversidad también fueron mayores que los obtenidos por Hayward (1985) en 40 poblaciones de Inglaterra (n° medio de alelos por locus = 3,09 y heterocigosidad esperada media = 0,372) mediante cinco loci, por Oliveira y Charmet (1988b) en poblaciones de raigrás inglés de Galicia (n° medio de alelos por locus = 3,16 y heterocigosidad esperada media = 0,395 mediante siete loci, y por Charmet *et al.* (1993) en 60 poblaciones de raigrás inglés francesas mediante siete loci polimórficos (n° medio de alelos por locus = 2,75 y heterocigosidad esperada media = 0,270). Las medias de

ambos parámetros fueron mayores en estos estudios que en el trabajo de Hamrick y Godt (1990) porque ninguno de los loci estudiados aquí fue monomórfico.

El valor medio del índice de fijación intrapoblación (FIS) indicó que en media hubo un déficit de heterocigotos dentro de las poblaciones. El valor medio de 0,286 para FIS es mayor que los valores indicados por Hayward y McAdam (1977) en cultivares de raigrás inglés, Oliveira y Charmet (1988b) en poblaciones naturales de raigrás inglés de Galicia y Charmet *et al.* (1993) en poblaciones francesas de raigrás inglés. Este déficit se puede deber al pequeño tamaño del vecindario y al efecto Wahlund como indica Charmet *et al.* (1993). Una población recogida en un lugar determinado puede incluir círculos de individuos (vecindarios) que están más relacionados genéticamente que dos miembros al azar de la población local total. El cruzamiento sería panmíctico sólo dentro de un vecindario.

El hecho de que la mayor parte de la diversidad genética sea debido al componente intrapoblacional (92% de la variabilidad isoenzimática total), sugiere que el muestreo de pocas poblaciones para la conservación de recursos fitogenéticos sería suficiente para preservar la mayor parte de la variabilidad isoenzimática. Para evitar los efectos de la deriva genética y de la depresión por consanguinidad sería necesario utilizar tamaños de población grandes en el momento de multiplicar las mismas.

3.1.7. Caracterización de *Lolium rigidum* Gaud.

Se caracterizaron en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (La Coruña) entre 1996 y 1997 (Oliveira y López, 1999) diez poblaciones españolas de raigrás anual (*Lolium rigidum* Gaud.).



Figura 19. Planta de *Lolium rigidum*.

Se aplicó un análisis de componentes principales con el fin de describir la variabilidad agro-morfológica. Las poblaciones mostraron una gran variabilidad para los caracteres agro-morfológicos e isoenzimáticos estudiados. La diversidad isoenzimática se evaluó mediante cinco loci polimórficos (PGI2, ACP2, IDH1, SKD1 y PGM1). Una de las poblaciones de nuestro trabajo (Pontevedra) mostró una fecha de espigado y una producción de forraje más tardías que el testigo empleado, al igual que una parecida abundancia de inflorescencias, lo cual parece indicar una capacidad similar de producción de semilla y con ello de autoresiembrado de la pradera. Los parámetros estadísticos de genética de poblaciones fueron más altos que los citados en otras especies alógamas (número medio de alelos = 3,7 y heterocigosidad media esperada = 0,493). La diversidad genética se explicó sobre todo por el componente intrapoblacional. La diferenciación interpoblacional sólo explicó un 12% de la diversidad total. En nuestro trabajo se observó una gran variabilidad agro-morfológica para la mayoría de los caracteres estudiados, apareciendo grupos de poblaciones con características distintivas. Así las poblaciones de Ibiza y Pontevedra son las que presentaron fechas de espigado y producciones de materia seca más tardías. Estas poblaciones podrían tener interés en zonas de clima Atlántico debido a su ciclo más tardío. Otro grupo de poblaciones formado por las de Zaragoza, Granada, Cádiz, Ourense, La Palma y Gomera, en cambio, presentaron fechas de espigado y producciones de materia seca más precoces. Estas poblaciones, parecería que estarían más adaptadas a las condiciones de clima Mediterráneo debido a su ciclo más precoz. Finalmente, las poblaciones de Mallorca y Málaga presentaron características intermedias.

3.2. Festucas y Poas

El género *Festuca* pertenece a la tribu *Festuceae* de la familia de las Gramíneas. El interés agronómico de las especies del género *Festuca* puede ser debido tanto a sus cualidades forrajeras como a sus cualidades cespitosas. La festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb. subsp. *arundinacea*) se puede emplear para una u otra utilización; su gran variabilidad permite en efecto seleccionar cultivares con hojas relativamente finas y con ahijamiento denso lo que gracias a su rusticidad permite utilizarla como cubierta vegetal. Excepto esta especie que se puede utilizar para los dos fines comentados anteriormente, las festucas para utilización forrajera se encuentran dentro de las especies de hojas anchas (sección *Bovinae*), tales como las subespecies de *Festuca arundinacea* y *Festuca pratensis*, mientras que las destinadas a una utilización de césped, pertenecen a la sección *Ovinae*: festuca roja cespitosa (*Festuca rubra* subsp. *commutata* o *Festuca nigrescens* subsp. *nigrescens*), festuca roja rastrera (*Festuca rubra* subsp. *rubra*), festuca roja semirastrera (*Festuca rubra* subsp. *trichophylla*) y la festuca ovina (*Festuca ovina* L.) (Portal, 1999).

La especie más conocida y la más utilizada del género *Poa* es sin duda la poa de los prados (*Poa pratensis* L.). Esta especie tiene una gran tolerancia al pastoreo frecuente y bajo por lo que se suele utilizar como especie integrante de los pastos para caballos y ovejas en Estados Unidos. A condición de regar, la poa pratense puede persistir en las zonas áridas o semiáridas. En períodos de sequía o de temperaturas altas, se produce una reducción de la parte aérea, pero cuando las condiciones son favorables se produce el rebrote a partir de los nudos de los rizomas subterráneos.

Prefiere los suelos bien drenados, fértiles y con pH entre 6 y 7. Se utiliza como planta forrajera, a menudo en mezclas, en Suiza (Charles y Lehmann, 1989) y en los países de Europa del Norte y sobre todo como planta de césped en todos los países europeos y en los Estados Unidos.

Otras especies de poa no tienen la importancia de la *Poa pratensis*, así por ejemplo la *Poa nemoralis* o poa de los bosques está muy adaptada a las zonas sombreadas y húmedas, pero tiene una vida muy corta y es muy sensible a las siegas. Es poco exigente en nutrición mineral, pero requiere suelos ricos en materia orgánica, arcillosos y húmedos. Se utiliza en céspedes

ornamentales y en campos de deportes (Fernández de Gorostiza, 1996). La *Poa alpina* está muy bien adaptada para el control de la erosión y es relativamente frecuente en zonas de media y alta montaña en pastizales sobre sustratos calizos (Mayor y Díaz, 1977).

3.2.1. Festucas altas y hongo endofitos

La festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb) presenta características interesantes por su potencial uso forrajero y ambiental. En el CIAM se conserva una colección de poblaciones naturales que se evaluó dentro del Programa Nacional de Conservación de Recursos Fitogenéticos. Se caracterizaron un total de 24 poblaciones naturales recolectadas en forma de semilla en diversas localidades del Norte de España y tres variedades comerciales.



Figura 20. Espigas de festuca alta.

El 90% de esas poblaciones resultaron infectadas (Oliveira y Castro, 1997), lo que está de acuerdo con el hecho de que las poblaciones naturales o naturalizadas de gramíneas potenciales hospedadoras de endofitos contienen niveles altos de infección (Holder *et al.*, 1994). Sin embargo, sólo el 41% de las muestras infectadas contenían hongos endofitos viables con un rango de variación del 70 al 100%. Esto indica una disminución rápida de la viabilidad del hongo endofito desde el momento de la recolección de las muestras en 1995 hasta el momento del estudio de la viabilidad del hongo. Esta pérdida de la viabilidad del hongo se debe previsiblemente a la conservación de las semillas en envases no herméticos, a 4 °C y 45-50% de humedad relativa.

Previamente a la siembra de las semillas para su evaluación agromorfológica se eliminó el hongo endofito para evitar su posible incidencia en los caracteres medidos (López

y Oliveira, 2002). El diseño experimental elegido fue en bloques completos al azar. Las variables medidas en cada individuo fueron la fecha de espigado, crecimientos (otoño, invierno, primavera, y en espigado), nº de inflorescencias, tolerancia a enfermedades, reespigado, altura en espigado, longitud y anchura de la hoja bandera y hábito de crecimiento. Los crecimientos medios de las poblaciones fueron superiores a los de las variedades y resultaron ser menos sensibles a enfermedades.

Un análisis de componentes principales (ACP) sobre la colección total explicó un 81% de la varianza con cuatro componentes. El *Factor 1* se relaciona con todas las variables de producción, nº de inflorescencias y altura total (*cri*, *crp*, *cre*, *ain* y *alp*). El *Factor 2* se relaciona con las variables de forma de hoja (*ahb* y *lhb*). El *Factor 3* se relaciona con la fecha de espigado y tolerancia a enfermedades (*fes* y *enf*) y finalmente el *Factor 4* se relaciona con el hábito de crecimiento y la alternitud (*hcr* y *alt*). Las poblaciones de mayor precocidad de espigado fueron las más productivas. Mediante una clasificación ascendente jerárquica (método de Ward) sobre los componentes principales con valores propios mayores de 1, se establecieron cinco grupos explicando un 67% de la varianza.

El hecho de que las poblaciones más precoces de espigado fuesen las más productivas, está de acuerdo con los datos obtenidos por Díaz *et al.* (1999) en un estudio realizado en el norte de España sobre 13 variedades comerciales, donde las más precoces resultaron ser algo más productivas.

Sin embargo, Paredes *et al.* (1986) obtuvieron las mayores productividades en variedades tardías en una evaluación realizada en el sur de España.

De las tres variedades estudiadas “Maris Kasba” (la más tardía) fue la de menor producción y “Tima” (de espigado intermedio) la de mayor. Dado que la especie no está específicamente mejorada para zonas húmedas (Piñeiro y Pérez, 1986), los datos indican que en tales zonas las variedades citadas pueden tener un comportamiento agronómico diferente del obtenido en el Sur de España, pudiendo resultar adecuado el uso de variedades creadas a partir de germoplasma autóctono.

A continuación, se presentan los valores medios de la caracterización realizada durante dos años en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo sobre las 24 accesiones viables de festuca alta.

Tabla 5. Valores medios de la caracterización agromorfológica de festuca alta, siendo: FES (fecha de espigado en nº de días a partir del 1 de enero), CRT (producción anual por planta en g de materia seca, ALT (alternatividad, siendo 0 no alternativa y 1 alternativa), AIN (número de inflorescencias por planta), ENF (tolerancia a enfermedades fúngicas, desde 1 baja a 5 alta), RES (respigado, siendo 0 no reespiga y 1 reespiga).

NOMBRE	FES	CRT	ALT	AIN	ENF	RES
POBLACIONES						
INSUA	107,76	316,40	1,00	125,69	3,62	0,30
TORRE1	112,14	357,28	1,38	125,79	3,67	0,62
TORRE2	84,56	229,59	1,00	52,28	2,55	0,60
GOIRIZ	70,14	457,84	1,71	116,92	3,62	0,29
MONDOÑEDO	96,50	447,09	1,59	98,23	4,44	0,50
BARCIA	109,08	314,00	1,13	131,39	3,29	0,33
INESPAL	72,43	316,42	1,36	92,63	3,15	0,70
MERA	121,67	202,61	1,33	105,56	4,00	0,00
CECEBRE	125,21	172,26	1,00	95,86	3,90	0,00
UNQUERA	100,52	261,21	1,67	112,32	3,25	0,50
ORTIGUEIRA	114,00	313,90	1,53	110,80	4,14	0,33
AVILES	108,06	327,76	1,00	121,08	3,63	0,25
BOLTAÑA	123,79	186,51	1,00	53,80	3,61	0,25
REGUERAL	106,37	447,94	2,23	141,71	3,35	0,46
QUIROS	112,37	137,87	1,00	58,26	2,67	0,50
MANZANAL	104,85	247,09	1,71	87,10	3,33	0,63
PEVIDAL	121,95	273,27	2,09	96,70	3,84	0,25
ANTROMERO	110,49	242,62	1,17	77,21	2,95	0,20
SALINES	115,22	329,14	1,46	111,35	3,74	0,27
CAMPADETORRES	102,11	364,74	1,67	134,10	3,69	0,38
PONFERRADA	95,94	244,51	1,22	65,97	3,02	0,60
PIEDELORO	103,37	448,20	1,00	124,65	2,88	0,13
NAVA	106,22	320,19	1,00	127,45	3,50	0,10
PERAN	108,06	289,17	2,06	87,00	3,54	0,57
Cultivares						
Tima	112,66	343,66	1,90	126,01	3,06	0,28
Mariscasba	121,34	222,33	1,00	82,04	3,09	0,18
Fawn	88,66	337,31	1,90	109,16	2,79	0,70

Tabla 5 (Continuación). Valores medios de la caracterización agromorfológica de festuca alta, siendo: ALP (altura de las plantas en cm), LHB (longitud de la hoja bandera en cm), AHB (anchura de la hoja bandera en mm) y HCR (hábito de crecimiento, desde 1 postrado a 5 erecto).

NOMBRE	ALP	LHB	AHB	HCR
POBLACIONES				
INSUA	152,61	17,36	8,17	3,42
TORRE1	156,04	21,49	9,93	2,87
TORRE2	148,52	20,82	7,94	4,00
GOIRIZ	133,85	16,82	7,33	2,62
MONDOÑEDO	156,11	24,95	11,34	3,57
BARCIA	142,58	17,80	7,36	3,50
INESPAL	117,22	16,12	6,81	2,15
MERA	104,99	16,09	5,97	3,36
CECEBRE	103,00	14,29	8,29	3,70
UNQUERA	127,56	23,77	9,46	2,50
ORTIGUEIRA	130,30	19,45	7,66	3,76
AVILES	157,38	18,17	8,55	2,75
BOLTAÑA	136,46	18,21	8,77	2,51
REGUERAL	155,47	23,24	9,32	2,85
QUIROS	121,93	15,03	6,31	2,84
MANZANAL	119,79	20,95	9,52	2,94
PEVIDAL	135,98	17,08	6,94	3,31
ANTROMERO	143,02	21,55	9,17	3,03
SALINES	126,42	22,07	8,84	1,98
CAMPADETORRES	146,28	23,46	9,48	2,22
PONFERRADA	134,96	19,81	9,36	3,55
PIEDELORO	159,78	19,44	7,68	2,94
NAVA	151,98	16,05	7,43	3,35
PERAN	130,33	22,62	8,68	2,79
Cultivares				
Tima	153,98	20,43	8,02	3,86
Mariscasba	151,64	17,86	8,02	3,86
Fawn	148,58	18,10	8,66	4,08

3.2.2. Festucas finas, poas y hongos endofitos

Se caracterizaron 33 accesiones (veintisiete de *Festuca* y seis de *Poa*) recogidas en la Cordillera Cantábrica (Oliveira *et al.*, 2001) junto con cuatro cultivares testigos (*Festuca ovina* “Ridu”, *Festuca rubra* subsp. *rubra* “Commodore”, *Festuca rubra* subsp. *commutata* “Vilma” y *Poa pratensis* “Compac”). La caracterización se realizó desde el año 2001 al 2003 en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (A Coruña) mediante 14 caracteres agromorfológicos evaluados en un campo de plantas aisladas con 30 plantas por accesión. Se determinó también la presencia del hongo endofito *Epichloë* en una muestra de 100 semillas por accesión.



Figura 21. Distribución geográfica de las 33 accesiones de festucas finas (cuadros blancos) y poas (cuadros negros).

De las 27 festucas finas examinadas, resultaron infectadas, en mayor o menor proporción, 17 de ellas representando un 63% del total. En el caso de la *Festuca* grupo *rubra*, todas las poblaciones resultaron infectadas. La frecuencia media de infección para la *Festuca* grupo *rubra*, fue de un 35,9% (d.t. =19,4). El nivel de infección varió del 2% en el caso de la población procedente de La Uña (León), al 64% de Acebedo (León).



Figura 22. Plantas de festucas finas.

De las 12 poblaciones de *Festuca* grupo *ovina* estudiadas, resultaron infectadas un 58% con una frecuencia media de 15,8% (d.t. = 22,3). El nivel de infección varió del 0% para cuatro de las poblaciones (tres de ellas en Asturias y una en Santander) al 64% en la población perteneciente a Villanueva de los Oscos en Asturias).

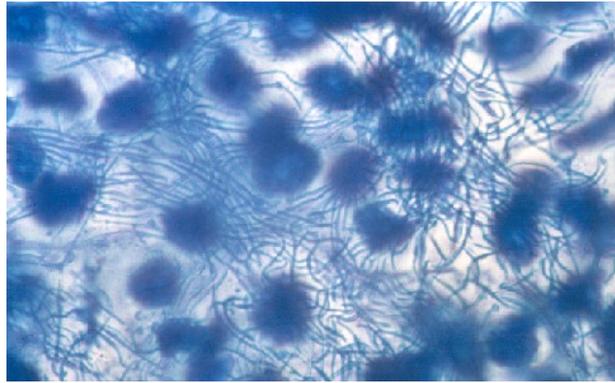


Figura 23. Micelio del hongo endofito (*Epichloë*) entre los granos de aleurona de una semilla.

En el caso de *Festuca vasconensis*, el porcentaje de infección con el hongo endofito fue de un 40% para las 5 poblaciones estudiadas. Su frecuencia media fue de un 23,9% (d.t. = 30,4), variando el nivel de infección de 0% en tres de las poblaciones (en Asturias) al 73% para la población del Faro de Ribadeo (Lugo).

La única *Festuca hystrix* analizada, no presentó presencia de infección con el hongo endofito mientras que la *Festuca paniculata* examinada, si resultó infectada con el hongo endofito con un nivel de infección del 6,7%.

De las 6 poas examinadas, solo una *Poa pratensis* (17% de las poas), resultó infectada.

En el caso de *Poa alpina*, no hubo ninguna de las tres poblaciones que resultara infectada, siendo su nivel de infección del 0%.

En las 2 poblaciones de *Poa pratensis* analizadas, la mitad de ellas, es decir una, tiene presente el hongo, con una frecuencia media de 6,3% (d.t. = 6,3). El nivel de infección varió entre el 0% para la población procedente de San Félix de Arce, y el 12,5% para la población procedente de Carande. En el caso de la única población de *Poa nemoralis* no se detectó la presencia del hongo endofito.

Estos resultados sugieren que la asociación entre hongos endofitos *Epichloë*, *Festuca* grupo *rubra* y *Festuca* grupo *ovina* es habitual y ocurre a frecuencias bajas a moderadas (0% a 50%) en los prados de la Cordillera Cantábrica.

El análisis de varianza y tests no paramétricos de los datos mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las accesiones, salvo para la variable “color de las hojas”. Las

accesiones presentaron un comportamiento agronómico similar al de los cultivares testigos. En la tabla siguiente aparecen las contribuciones (porcentajes de varianza), de cada variable inicial, en cada eje del análisis factorial de correspondencias, de modo que cuanto más alto sea el valor de dicho porcentaje, más alta será la importancia de dicha variable en el eje correspondiente. Las variables LHB, ALP, CRV, CRP y LOINF representan ellas solas el (13,6 + 13,5 + 12,1 + 11,6 + 11,5) 62% de la varianza del primer eje, mientras que las variables AHB y ENFOT explican el 35,5% de la varianza del segundo eje.

Tabla 6. Medias y rangos de variación de las poblaciones caracterizadas en el CIAM en los años 2001, 2002 y 2003 para las variables: fecha de espigado (FES, en días a partir del 1 de enero), longitud de hoja bandera (LHB, en cm), anchura de hoja bandera (AHB, en mm), altura en floración (ALP, en cm), longitud de inflorescencia (LOINF, en mm), rizomas (RI, 1 ausencia, 2 presencia), crecimiento otoño (CRO, 1 poco a 5 mucho) crecimiento verano (CRV, 1 poco a 5 mucho), habito de crecimiento (HAB, 1 erecto a 5 postrado), enfermedades de hoja en otoño (ENFOT, 1 sensible a 5 tolerante), anchura de hoja (AH, 1 estrecho a 5 ancho), color de hojas (CLOT, 1 verde claro a 5 verde oscuro), crecimiento primavera (CRP, 1 poco a 5 mucho), enfermedades de hoja en primavera (ENFPRI, 1 sensible a 5 tolerante) y porcentaje de infección con hongos endofitos (ENDO en %).

Variables	Accesiones	Testigos
	Medias (Rango de variación)	Medias (Rango de variación)
FES	103,6 (89,9-125,4)	101,6 (97,6-105,6)
LHB	10,3 (4,8-15,2)	9,9 (6,5-12,4)
AHB	2,3 (1,0-3,9)	2,6 (2,1-3,8)
ALP	68,3 (39,1-98,2)	68,5 (43,3-80,0)
LOINF	12,9 (7,1-19,9)	13,0 (9,8-14,8)
RI	1,2 (1,0-2,0)	1,2 (1,0-2,0)
CRO	3,1 (2,1-4,0)	2,9 (2,5-3,2)
CRV	3,1 (2,3-4,0)	3,2 (2,5-3,6)
HAB	2,9 (1,6-3,9)	2,6 (1,9-3,1)
ENFOT	3,4 (1,7-4,4)	2,6 (1,9-3,1)
AH	2,7 (1,7-4,2)	2,7 (2,1-3,3)
CLOT	3,6 (2,8-4,6)	3,5 (3,3-4,1)
CRP	3,2 (2,2-3,9)	3,3 (3,2-3,4)
ENFPRI	3,1 (1,8-3,7)	2,9 (1,8-3,2)
ENDO	18,6 (0,0-73,0)	0,0 (0,0-0,0)

Tabla 6 (Continuación). Cuadrados medios del análisis de varianza en las poblaciones caracterizadas en el CIAM en los años 2001, 2002 y 2003 para las variables cuantitativas: fecha de espigado (FES, en días a partir del 1 de enero), longitud de hoja bandera (LHB, en cm), anchura de hoja bandera (AHB, en mm), altura en floración (ALP, en cm) y longitud de inflorescencia (LOINF, en mm), y tests no paramétricos de la U de Mann-Whitney para la variable rizomas (RI, 1 ausencia, 2 presencia) y de Kruskal-Wallis para las variables: crecimiento otoño (CRO, 1 poco a 5 mucho) crecimiento verano (CRV, 1 poco a 5 mucho), habito de crecimiento (HAB, 1 erecto a 5 postrado), enfermedades de hoja en otoño (ENFOT, 1 sensible a 5 tolerante), anchura de hoja (AH, 1 estrecho a 5 ancho), color de hojas (CLOT, 1 verde claro a 5 verde oscuro), crecimiento primavera (CRP, 1 poco a 5 mucho) y enfermedades de hoja en primavera (ENFPRI, 1 sensible a 5 tolerante) y porcentaje de infección con hongos endofitos (ENDO en %); ns: no significativo; ***: significativo al nivel de 0,001.

Variables	Cuadrados medios		
	Accesiones	Accesiones * año	Error
FES	3337,09***	744,52***	283,66
LHB	434,68***	19,66ns	17,62
AHB	31,51***	2,09ns	2,55
ALP	10966,20***	954,49***	298,25
LOINF	455,87***	30,16ns	23,18
	Tests no paramétricos		
RI	64883,50***		
CRO	31,49***		
CRV	46,71***		
HAB	29,76***		
ENFOT	61,74***		
AH	119,86***		
CLOT	6,69ns		
CRP	27,82***		
ENFPRI	78,48***		
ENDO	-	-	-

Tabla 7. Contribuciones (%) de las variables a la varianza explicada por los ejes de un análisis factorial de correspondencias. Las mayores contribuciones aparecen en negrita.

Variables	Eje 1	Eje 2	Eje 3	Eje 4	Eje 5
RI	0,4	0,2	11,6	11,8	0,0
CRO	10,7	2,8	15,8	16,8	1,5
CRV	12,1	7,5	8,4	10,2	6,2
HAB	0,7	5,1	1,1	4,5	12,2
ENFOT	2,3	16,8	0,2	1,8	12,2
AH	6,5	7,1	6,6	5,0	3,2
CRP	11,6	0,6	19,5	9,9	3,9
ENFPRI	4,2	4,1	5,6	3,2	19,7
FES	0,8	8,8	10,1	13,9	0,5
LHB	13,6	7,4	2,1	4,5	13,5
AHB	7,8	18,7	3,7	1,9	0,2
ALP	13,5	12,0	0,6	4,5	0,3
LOINF	11,5	8,8	6,2	4,5	3,2
ENDO	4,5	0,1	8,4	7,2	23,5

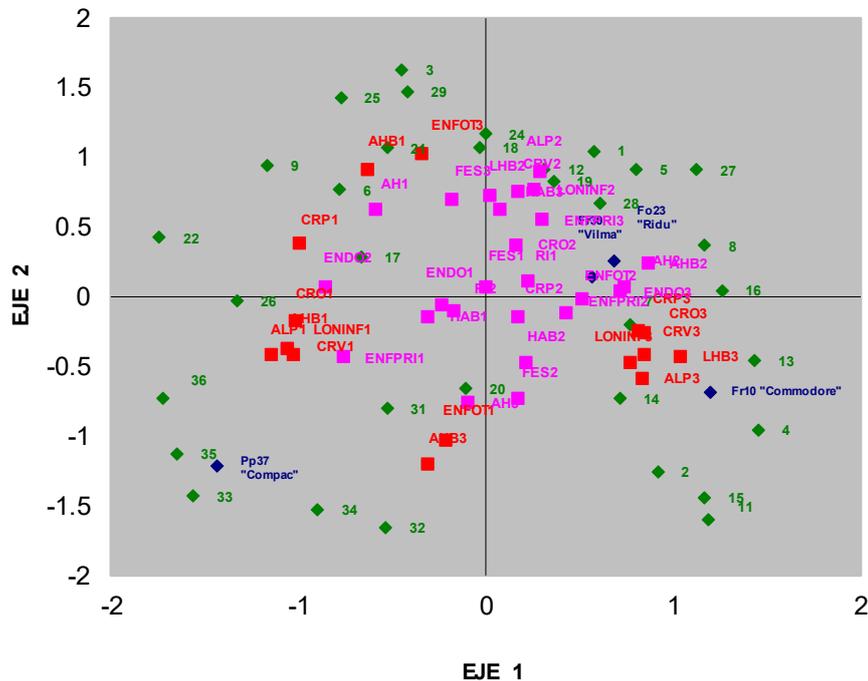


Figura 24. Plano factorial 1-2 (56% de la varianza total). Proyección de las 33 accesiones de Festucas y Poas junto con las var. comerciales “Ridu” de *Festuca ovina*, “Commodore” de *Festuca rubra* subsp. *rubra*, “Vilma” de *Festuca rubra* subsp. *commutata* y “Compac” de *Poa pratensis* y las 41 modalidades de las 14 variables estudiadas: fecha de espigado (FES), longitud de hoja bandera (LHB), anchura de hoja bandera (AHB), altura en floración (ALP), longitud de inflorescencia (LOINF), rizomas (RI), crecimiento otoño (CRO), crecimiento verano (CRV), habito de crecimiento (HAB), enfermedades de hoja en otoño (ENFOT), anchura de hoja (AH), crecimiento primavera (CRP), enfermedades de hoja en primavera (ENFPRI) y % de infección con hongos endofitos (ENDO).

En el plano factorial 1-2 que es el formado por los dos primeros ejes (los que suministran mayor cantidad de información), se observa en el lado positivo del primer eje, correspondencias entre: crecimientos de primavera (CRP), verano (CRV) y otoño (CRO), importante longitud de hojas banderas (LHB), inflorescencias largas y alturas en floración elevadas (LONINF) y altura en floración (ALP), incluyendo la inflorescencia, con la *Festuca* grupo *rubra* nº 13 de Paramios y nº 16 de Santa Eulalia de los Oscos y *Festuca* grupo *ovina* nº 4 de Villanueva de los Oscos.

En el lado negativo del eje 1, están presentes algunas accesiones de *Festuca* grupo *ovina* como la nº 26 y la nº 22 y la *Poa nemoralis* nº 36.

En el lado positivo del eje 2 aparecen las accesiones que presentan mayor tolerancia a las enfermedades de otoño (ENFOT), hojas banderas más estrechas (AHB) como la *Festuca vasconensis* n° 29 y las muestras de *Festuca* del grupo ovina n° 3 y 25.

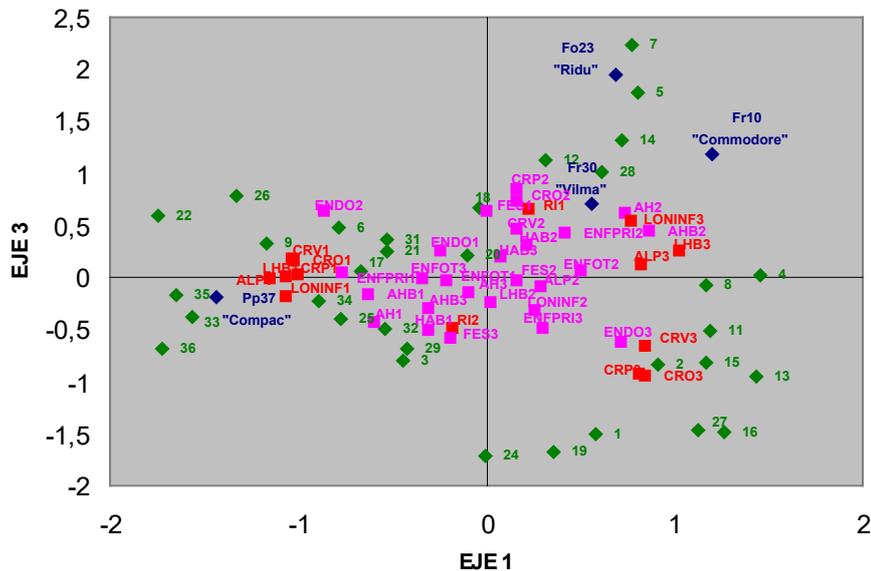


Figura 25. Plano factorial 1-3 (48,7% de la varianza total). Proyección de las 33 accesiones de Festucas y Poas junto con las var. comerciales “Ridu” de *Festuca ovina*, “Commodore” de *Festuca rubra* subsp. *rubra*, “Vilma” de *Festuca rubra* subsp. *commutata* y “Compac” de *Poa pratensis* y las 41 modalidades de las 14 variables estudiadas: fecha de espigado (FES), longitud de hoja bandera (LHB), anchura de hoja bandera (AHB), altura en floración (ALP), longitud de inflorescencia (LONINF), rizomas (RI), crecimiento otoño (CRO), crecimiento verano (CRV), habito de crecimiento (HAB), enfermedades de hoja en otoño (ENFOT), anchura de hoja (AH), crecimiento primavera (CRP), enfermedades de hoja en primavera (ENFPRI) y % de infección con hongos endofitos (ENDO).

En el lado positivo del eje 1 del plano factorial 1-3, las mayores contribuciones a los ejes factoriales son de los valores altos de la altura de floración (ALP), la longitud de la inflorescencia (LONINF), la longitud de hoja bandera (LHB), y los mayores crecimientos en primavera, verano, otoño (CRP, CRV y CRO), destacando las accesiones de *Festuca* grupo *ovina* n° 4 de Villanueva de los Oscos y *Festuca* grupo *rubra* n° 8 de Tanes (Caso).

En el lado negativo del eje 1, las anteriores variables presentan los valores más bajos, junto con el crecimiento de primavera (CRP), verano (CRV) y otoño (CRO), siendo la mayoría de las accesiones del género *Poa*.

En el lado positivo del eje 3, las variables que más contribuyen son el crecimiento en primavera (CRP) y en otoño (CRO) presentando valores medios, y la presencia de los rizomas (RI), estando presente la accesión de *Festuca* grupo *ovina* nº 7 de Puerto de Tarna (León), nº 5 de Grandas de Salime (Asturias) y *Festuca* grupo *ovina* (testigo “Ridu”) nº 23.

En el lado negativo del eje, las variables anteriores presentan los valores más elevados, siendo en este caso las accesiones de *Festuca* grupo *ovina* nº 1 de Niserias (Asturias), nº 24 de Merodio (Asturias) y *Festuca vasconensis* nº 19 playa de Penarronda (Asturias) las mejor representadas.

4. Gestión de recursos fitogenéticos

4.1. Creación de colecciones nucleares

Considerando el gran número de poblaciones naturales españolas del género *Lolium* recogidas en el curso de estos años (117) y de la pequeña cantidad de semilla disponible, nos ha parecido necesario definir métodos de muestreo dentro de las poblaciones con el fin de constituir una colección de referencia o “core collection” representativa del conjunto de la diversidad de las poblaciones del género *Lolium* en España.



Figura 26. Distribución de los puntos de muestreo de las accesiones de raigrás inglés e italiano (74 y 43 respectivamente). Los círculos corresponden al raigrás inglés y los triángulos al raigrás italiano.

Durante dos años se evaluaron un total de 74 accesiones de raigrás inglés y 43 de *Lolium multiflorum* pertenecientes a la colección de gramíneas pratenses conservada en el

CIAM. El estudio se inició en 1998 en el CIAM de A Coruña, situado en Mabegondo (43° 15' N, 8° 18' O) a 100 m de altitud. Las semillas utilizadas fueron sometidas a un tratamiento de calor (Nott y Latch, 1993) para eliminar el hongo endofito y evitar sus posibles interacciones con las accesiones en la evaluación agronómica. Las variables significativas en el análisis de varianza se utilizaron en una clasificación ascendente jerárquica mediante el método de Ward. Como tamaño de la colección núcleo se fijó el 12% de la colección base para raigrás inglés y el 16% para raigrás italiano, en exceso del 10% propuesto como mínimo por Brown (1989). Por tanto, se estableció el número de grupos de la clasificación jerárquica en 9 en el caso de raigrás inglés y en 7 en el caso del raigrás italiano. Se compararon diversas estrategias para crear dichas colecciones nucleares.

Estos métodos incluyeron muestreos estratificados y aleatorios basados en la clasificación jerárquica, en el índice de diversidad de Shannon y en la máxima contribución a la varianza en un análisis de componentes principales. Ninguna de las colecciones nucleares creadas mostró diferencias en las medias y en las varianzas mediante la prueba de Wilcoxon. Las colecciones nucleares seleccionadas en la estrategia de mayor contribución a la varianza fueron las que presentaron un mayor porcentaje de retención de los rangos de variación, por lo que se consideran la más adecuadas para el mantenimiento de la diversidad de las colecciones base.



Figura 27. Distribución de las accesiones seleccionadas por el método 6 en la Península Ibérica. Los círculos corresponden al raigrás inglés y los triángulos al raigrás italiano

A continuación, se presentan los valores medios de la caracterización realizada durante dos años en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo sobre las accesiones viables de raigrás inglés e italiano (74 y 43 respectivamente).

Tabla 8a. Valores medios de la caracterización agromorfológica de raigrás inglés, siendo: FES (fecha de espigado en nº de días a partir del 1 de enero), CRT (crecimiento anual en g de materia seca por planta), ALP (altura de las plantas en cm), RES (respigado, siendo 0 no reespiga y 1 reespiga, ENF (tolerancia a enfermedades fúngicas, desde 1 baja a 5 alta).

NOMBRE	FES	CRT	ALP	RES	ENF
POBLACIONES					
ROUPAR	146,78	134,16	74,84	0,15	3,30
PIEDRAFITA	136,08	223,15	90,23	0,00	2,36
CEBREROS	131,43	142,87	87,58	0,30	3,24
LAMPAZA	142,49	220,21	81,09	0,16	3,51
SMIGUELDETABAGON	147,83	316,47	82,61	0,84	4,59
SANTAMARIADEOYA	137,22	278,11	89,71	0,50	3,72
LOURO	136,62	162,34	86,38	0,63	3,95
LOBELOS	150,23	181,02	66,37	0,24	2,86
BERDOYAS	151,30	249,55	74,62	0,10	4,14
VALVERDERIOTORTO	132,93	213,17	99,65	0,79	4,18
AIREJE	134,18	208,18	99,37	0,25	2,55
DONCOS	134,86	184,98	84,16	0,25	3,45
NOCEDAL	134,51	142,92	82,43	0,10	3,14
SANFITORIO	141,97	197,47	67,05	0,00	3,20
RUMIN	144,31	222,44	78,55	0,05	3,47
BALBOA	139,12	168,70	83,66	0,16	3,62
ANGERIZ	131,62	182,26	87,29	0,26	3,49
FONTEO	139,46	202,01	81,01	0,24	3,83
PUEBLADETRIVES	138,33	204,38	91,51	0,00	2,82
SANMIGUEL	138,72	135,79	75,47	0,00	3,08
ATREPA	135,99	180,22	83,17	0,00	3,80
CARNOTA	142,73	188,44	76,88	0,32	2,77
CALDASDEREIS	140,52	218,92	90,94	0,61	3,26
SILLEDALP	145,22	245,27	78,04	0,07	3,74
COIROAREGUEIRA	145,18	214,78	70,94	0,16	3,68
BORRAXEIOS	142,44	183,03	80,50	0,39	3,40
CERCEDA	138,47	169,45	93,62	1,00	3,97
LAROLP	139,71	248,97	89,06	0,53	3,29
LALANZADA playa	140,10	150,75	73,95	0,33	3,29
AVILES	112,87	171,07	82,70	0,21	3,06
MARCENADO	116,45	158,48	88,84	0,23	3,06
RIBADUMIA	144,79	295,78	87,71	0,63	4,26
SANANTON	137,64	178,67	87,18	0,60	3,70
LATORRE	141,72	198,29	76,93	0,15	3,26
RIAZOR	140,98	273,58	88,09	0,80	4,15

Tabla 8a (Continuación).

NOMBRE	FES	CRT	ALP	RES	ENF
POBLACIONES					
CARIÑO	147,82	420,76	84,19	0,00	4,09
FERREIRA	134,96	220,98	94,43	0,00	3,96
SOTODEDUENAS	133,10	226,30	95,84	0,47	3,20
VEGADEO	132,96	301,01	105,34	0,41	3,65
SANMARTINDEOSCOS	120,51	193,91	91,53	0,26	3,34
BOAL	118,06	163,30	90,77	0,42	3,25
NAVIA	130,48	223,54	100,28	0,63	2,96
BUSTOLP	126,32	190,11	88,25	0,00	3,54
CUDILLERO	127,41	193,68	81,90	0,00	3,00
SANDICHEGRADO	137,70	221,02	87,28	0,37	4,19
LIANDRES	123,14	199,85	85,08	0,05	3,42
SAMANO	132,13	222,15	85,65	0,05	3,75
IGUELDO	118,23	228,89	89,01	0,00	3,10
PANTINLP	145,50	228,43	73,50	0,45	3,45
TRASPARGA	131,65	232,10	96,08	0,05	2,96
VIVERO	121,58	171,98	91,63	0,35	3,18
VENTORRILLO	137,85	289,91	88,97	0,53	3,88
RONDADENELLE	141,12	273,61	83,97	0,72	3,98
PACIOS	141,67	221,52	90,17	0,05	4,02
OZADELOSRIOS	141,81	221,08	86,68	0,21	3,63
LASVIBORAS	132,63	207,47	74,14	0,00	3,63
ALGAIDA	114,63	142,41	76,64	0,08	3,16
RODICIO	139,30	250,64	89,66	0,22	3,24
PONTEAREAS	144,76	191,27	75,88	0,10	3,60
PONFERRADALP	129,35	122,08	82,49	0,06	3,85
ASTORGA	132,37	109,51	83,33	0,00	3,29
LA BAÑEZA	146,80	256,41	87,56	0,06	4,23
BARRIOSDELUNA	132,49	71,93	65,21	0,00	3,27
SALAMON	140,30	226,94	84,08	0,55	3,53
FELECHAS	126,49	91,99	78,53	0,06	2,95
LAMAGDALENA	133,62	159,14	96,04	0,19	2,80
CANABAL	142,11	121,37	80,12	0,00	3,12
TOURON	141,23	195,12	85,91	0,95	3,61
LAJUNQUERAMURCIA	137,99	112,24	65,27	0,00	2,38
SEGOVIA	132,50	154,60	84,53	0,06	3,24
JACA	132,99	197,98	95,63	0,19	3,13
SEODEURGELL	124,94	173,56	89,42	0,16	3,26
ARGELAGUER	140,04	106,14	77,00	0,06	2,93
VITORIA	132,83	96,90	75,85	0,10	2,32

Tabla 8a (Continuación).

NOMBRE	FES	CRT	ALP	RES	ENF
Cultivares					
Cropper	129,61	147,74	88,01	0,00	3,33
Talbot	147,09	169,09	81,02	0,00	2,59
Vigor	169,40	173,26	65,25	0,00	3,26
Arion	112,31	135,96	80,98	0,00	2,98
Brigantía	140,13	217,84	91,95	0,32	3,40
Ciami	147,64	318,05	83,06	0,78	4,05

Tabla 8b. Valores medios de la caracterización agromorfológica de raigrás inglés, siendo: LHB (longitud de la hoja bandera en cm), AHB (anchura de la hoja bandera en mm), AIN (número de inflorescencias por planta) y HCR (hábito de crecimiento, desde 1 postrado a 5 erecto).

NOMBRE	LHB	AHB	AIN	HCR
POBLACIONES				
ROUPAR	13,07	4,75	140,14	2,33
PIEDRAFITA	13,60	4,77	86,38	3,63
CEBREROS	14,32	5,03	126,84	3,33
LAMPAZA	12,83	4,79	133,33	3,33
SMIGUELDETABAGON	13,84	5,20	155,61	2,72
SANTAMARIADEOYA	15,37	5,13	96,67	2,88
LOURO	15,57	4,53	166,01	2,91
LOBELOS	14,05	4,92	71,39	2,55
BERDOYAS	11,64	4,30	104,78	2,53
VALVERDERIOTORTO	13,56	5,08	124,04	3,58
AIREJE	19,48	6,35	92,85	2,33
DONCOS	13,70	4,66	84,72	2,54
NOCEDAL	14,51	4,57	78,84	3,27
SANFITORIO	12,18	4,62	109,58	2,32
RUMIN	13,49	4,92	98,65	2,78
BALBOA	16,79	4,85	110,00	3,43
ANGERIZ	13,51	4,85	90,25	2,73
FONTEO	10,90	4,13	90,32	2,86
PUEBLADETRIVES	13,43	4,70	90,04	3,18
SANMIGUEL	12,63	4,95	102,28	2,88
ATREPA	11,29	4,19	116,97	3,50
CARNOTA	12,36	4,44	100,22	3,38
CALDASDEREIS	13,42	5,13	115,73	3,53
SILLEDALP	15,40	6,08	89,08	2,50
COIROAREGUEIRA	11,05	4,12	88,83	2,53
BORRAXEIOS	11,75	4,75	123,80	3,06
CERCEDA	16,42	6,41	83,40	3,07
LAROLP	11,67	4,58	125,68	3,29
LALANZADA playa	10,64	4,79	148,61	2,58
AVILES	14,00	5,92	65,92	2,82
MARCENADO	15,31	5,34	69,26	3,64
RIBADUMIA	16,27	5,36	123,00	3,00
SANANTON	12,85	4,80	93,30	2,60
LATORRE	10,76	4,22	126,00	3,50
RIAZOR	14,70	5,08	122,32	2,38

Tabla 8b (Continuación).

NOMBRE	LHB	AHB	AIN	HCR
POBLACIONES				
CARIÑO	13,88	6,11	115,23	2,57
FERREIRA	14,06	4,81	90,18	3,07
SOTODEDUENAS	15,08	5,61	109,90	3,82
VEGADEO	16,13	5,67	115,23	3,23
SANMARTINDEOSCOS	18,81	6,58	100,63	2,46
BOAL	16,25	5,48	103,08	3,06
NAVIA	14,38	5,11	117,90	2,92
BUSTOLP	18,65	6,96	117,64	3,00
CUDILLERO	16,60	5,65	105,20	2,58
SANDICHEGRADO	12,94	5,00	115,64	3,27
LIANDRES	16,57	4,95	72,63	2,50
SAMANO	14,03	5,10	104,87	2,63
IGUELDO	16,62	5,55	96,95	2,40
PANTINLP	12,09	4,50	110,46	2,56
TRASPARGA	16,13	5,43	97,97	2,73
VIVERO	15,68	5,31	115,08	2,81
VENTORRILLO	13,51	4,92	134,61	3,36
RONDADENELLE	14,27	5,06	108,30	3,06
PACIOS	14,48	4,82	98,85	3,14
OZADELOSRIOS	14,49	5,00	88,89	2,64
LASVIBORAS	14,26	4,70	84,76	1,86
ALGAIDA	13,07	4,72	83,27	3,33
RODICIO	14,71	5,18	105,93	3,15
PONTEAREAS	13,69	5,08	86,94	2,58
PONFERRADALP	12,83	4,32	89,31	3,08
ASTORGA	13,53	4,78	98,19	3,56
LA BAÑEZA	17,62	5,48	121,18	3,93
BARRIOSDELUNA	12,75	4,50	72,74	3,22
SALAMON	13,76	4,95	123,92	3,78
FELECHAS	15,84	5,62	96,56	2,82
LAMAGDALENA	14,72	5,52	117,99	3,71
CANABAL	10,05	4,07	95,31	3,31
TOURON	14,49	6,26	82,08	3,08
LAJUNQUERAMURCIA	12,81	4,55	76,48	2,40
SEGOVIA	11,55	4,44	91,21	2,65
JACA	14,15	4,93	89,19	2,89
SEODEURGELL	16,34	6,22	96,82	3,78
ARGELAGUER	12,49	4,67	108,70	2,50
VITORIA	15,53	5,67	118,35	2,90

Tabla 8b (Continuación).

NOMBRE	LHB	AHB	AIN	HCR
Cultivares				
Cropper	15,67	5,39	104,71	2,35
Talbot	16,40	5,47	129,90	3,00
Vigor	15,64	5,40	59,38	2,58
Arion	14,36	5,09	52,92	2,79
Brigantia	13,48	5,17	121,34	2,80
Ciami	13,16	4,78	154,73	2,88

Tabla 9a. Valores medios de la caracterización agromorfológica de raigrás italiano, siendo: FES (fecha de espigado en nº de días a partir del 1 de enero), CRP (crecimiento de primavera en g de materia seca por planta), CRE (crecimiento en espigado en g de materia seca por planta), CRV (crecimiento en verano en g de materia seca por planta), CRT (crecimiento anual en g de materia seca por planta).

NOMBRE	FES	CRP	CRE	CRV	CRT
POBLACIONES					
BUSTOLM	103,85	13,08	41,83	0,00	54,91
POLADESIERO	127,98	21,71	72,83	26,54	121,08
LANUEVA	117,75	13,06	69,08	23,37	105,51
UNQUERALM	135,90	9,38	76,64	27,28	113,30
COMILLAS	132,42	24,61	110,97	43,39	178,97
SOLARES	133,78	44,81	161,95	55,03	261,79
HERAS	134,03	36,65	137,68	60,69	235,02
LEKEITIO	136,79	14,26	104,46	48,73	167,45
IZIAR	129,70	14,84	92,59	25,16	132,59
AYA	132,60	16,77	80,57	24,51	121,85
PANTINLM	132,74	25,68	98,45	36,42	160,55
ORTIGUEIRA1LM	133,06	35,44	109,10	41,16	185,70
VIVEIRO	134,84	14,10	71,44	21,15	106,69
ORTIGUEIRA2LM	132,61	27,32	95,55	29,27	152,14
CAZALGA	132,49	17,05	81,09	22,12	120,26
CASTRO	134,90	29,65	127,05	33,88	190,58
CORDEIRO	75,29	23,64	27,61	0,00	51,25
PORTAS	81,32	8,23	22,00	0,00	30,23
REDONDELA	74,63	7,80	18,99	0,00	26,79
MOS	83,54	30,17	42,07	0,00	72,24
CANGAS MORRAZO	81,34	9,81	19,44	0,00	29,25
SANJENJO	79,59	16,95	29,04	0,00	45,99
VIMIANZO	88,74	19,41	34,13	0,00	53,54
ORDENES	112,90	17,32	92,03	35,06	144,41
RIAL	120,26	12,77	56,12	19,77	88,66
SANTACOMBALM	125,91	28,12	105,25	28,24	161,61
ABEGONDO	97,58	19,09	37,07	0,00	56,16
LUARCA	97,06	15,94	36,89	0,00	52,83
MUROSDELNALON	135,13	33,74	110,17	29,79	173,70
PRAVIA1	95,83	17,14	37,50	0,00	54,64
PRENDES	97,47	12,71	27,16	0,00	39,87
BAÑUGUES	99,09	30,24	43,17	0,00	73,41
CANDAS	115,27	25,62	91,39	27,03	144,04
PADRON1	120,59	22,05	119,85	29,42	171,32
FILGUEIRA	78,53	11,82	23,96	0,00	35,78
CANICOUVA2	74,33	12,46	21,96	0,00	34,42
BERDUCIDO	76,87	23,93	31,04	0,00	54,97

Tabla 9a (Continuación).

NOMBRE	FES	CRP	CRE	CRV	CRT
PRAVIA2	98,88	10,64	35,45	0,00	46,09
SILLEDALM	134,39	22,50	85,75	35,14	143,39
SAUZAL	111,65	9,91	30,42	0,00	40,33
LAPADILLA	119,41	9,39	52,15	0,00	61,54
LAVEGA	117,51	10,19	43,00	0,00	53,19
LOSRODEOS	117,36	14,81	46,10	0,00	60,91
GODOS	136,90	7,11	50,80	5,05	62,96
RIGORTIA	136,16	12,13	83,75	31,99	127,87
Cultivares					
Vallico Portugal	120,98	13,83	64,13	20,13	98,09
Vitesse	135,41	28,47	105,20	32,01	165,68
Final (Ninak)	132,32	19,98	119,47	33,97	173,42
Exalta	137,40	40,07	127,16	48,65	215,88
Promenade	136,16	30,39	110,75	28,23	169,37

Tabla 9b. Valores medios de la caracterización agromorfológica de raigrás italiano, siendo: AHB (anchura de la hoja bandera en mm), LHB (longitud de la hoja bandera en cm), AIN (número de inflorescencias por planta), ALP (altura de las plantas en cm), ENF (tolerancia a enfermedades fúngicas, desde 1 baja a 5 alta), y HCR (hábito de crecimiento, desde 1 postrado a 5 erecto).

NOMBRE	AHB	LHB	AIN	ALP	ENF	HCR
POBLACIONES						
BUSTOLM	7,58	14,90	71,65	58,89	3,07	3,08
POLADESIERO	7,95	19,06	77,83	102,29	2,78	3,22
LANUEVA	7,28	16,31	82,57	90,98	3,45	3,33
UNQUERALM	8,18	19,44	73,20	109,99	3,87	3,23
COMILLAS	8,07	20,12	96,03	112,64	3,75	2,94
SOLARES	8,57	23,22	128,22	106,42	3,65	2,92
HERAS	8,58	22,04	83,33	114,91	3,78	3,74
LEKEITIO	7,58	20,21	84,04	101,39	3,62	3,15
IZIAR	6,90	17,08	81,75	92,10	3,81	2,61
AYA	7,61	21,51	66,77	102,64	3,40	3,58
PANTINLM	8,06	18,90	86,86	103,72	3,19	2,69
ORTIGUEIRA1LM	8,29	20,23	105,61	115,81	3,32	2,99
VIVEIRO	7,63	19,72	67,66	90,20	3,19	2,45
ORTIGUEIRA2LM	7,81	18,48	91,08	105,61	3,85	2,81
CAZALGA	7,26	17,53	75,07	95,29	3,67	2,58
CASTRO	11,20	28,08	71,72	120,80	3,78	3,92
CORDEIRO	6,86	12,14	56,59	53,07	3,03	2,93
PORTAS	6,82	13,27	48,85	51,67	2,95	3,13
REDONDELA	7,02	11,81	37,64	55,38	2,79	3,58
MOS	8,61	14,91	64,77	69,43	2,94	3,17
CANGAS MORRAZO	7,08	11,78	57,97	55,76	3,40	3,06
SANJENJO	7,82	12,97	57,26	57,12	3,19	2,97
VIMIANZO	7,90	14,41	65,97	57,34	3,22	2,76
ORDENES	8,36	18,06	80,79	82,72	3,40	3,18
RIAL	7,49	16,35	54,46	105,20	2,93	3,01
SANTACOMBALM	8,16	19,31	66,25	111,48	3,68	3,30
ABEGONDO	6,81	13,05	68,94	61,60	3,00	3,14
LUARCA	8,59	15,52	70,93	58,29	3,16	2,80
MUROSDELNALON	12,30	26,99	65,82	119,44	2,83	4,18
PRAVIA1	7,68	14,71	74,79	54,78	3,66	2,66
PRENDES	8,27	17,29	65,61	53,22	4,39	3,10
BANUGUES	9,28	18,70	84,66	74,57	3,43	3,21
CANDAS	7,13	15,07	75,17	99,97	3,38	3,78
PADRON1	8,33	20,46	74,46	114,28	3,50	3,56
FILGUEIRA	7,24	12,07	50,15	58,40	3,19	3,30
CANICOUVA2	6,50	10,02	50,74	54,35	2,97	3,02
BERDUCIDO	8,38	13,40	63,19	56,73	2,53	2,57

Tabla 9b (Continuación).

NOMBRE	AHB	LHB	AIN	ALP	ENF	HCR
PRAVIA2	8,39	16,49	69,31	72,24	3,54	2,95
SILLEDALM	8,80	19,68	85,25	100,04	3,50	2,58
SAUZAL	8,03	14,39	47,71	77,30	2,11	1,91
LAPADILLA	7,27	14,66	54,73	76,00	2,59	2,30
LAVEGA	7,77	14,80	62,80	84,87	2,20	2,08
LOSRODEOS	7,54	14,31	73,80	77,68	2,66	2,76
GODOS	5,72	14,02	72,02	64,78	3,79	1,81
RIGORTIA	8,68	21,52	76,59	100,31	3,58	2,78
Cultivares						
Vallico Portugal	8,81	18,75	74,23	101,02	2,97	3,35
Vitesse	8,40	24,03	80,33	105,45	3,03	3,06
Final (Ninak)	10,10	25,27	72,36	108,11	3,19	3,91
Exalta	8,41	24,41	90,04	108,23	3,18	3,07
Promenade	10,96	28,31	55,54	117,11	2,91	4,45

4.2. Multiplicación de gramíneas pratenses

4.2.1. Introducción

La multiplicación es uno de los procesos más delicados en el mantenimiento de las muestras en los bancos de germoplasma, ya que se puede producir pérdida de diversidad (Breese y Tyler, 1981). En especies alógamas anemófilas y autoincompatibles (Fearon *et al.*, 1983) como es el caso del raigrás italiano, la necesidad de aislamiento restringe el número de muestras que pueden ser multiplicadas en una misma superficie (Guy *et al.*, 1989).

Dentro de cada población, hay a menudo grandes diferencias en el rendimiento en semilla por planta, por lo que se suele recomendar recoger igual cantidad de semilla de cada planta para tratar de evitar cambios genéticos y posibles pérdidas de alelos adaptativos (Breese y Tyler, 1981). Este método requiere unas necesidades grandes de mano de obra y debido a las limitaciones en recursos no siempre es el más utilizado. En general, la semilla se recoge en conjunto en 90-100 plantas por población. De esta manera, tras la multiplicación, la cantidad de semilla disponible por población varía de 100 a 800 gramos.



Figura 28. Campos de multiplicación de gramíneas pratenses. Ensacado de plantas para evitar la diseminación de la semilla.

La multiplicación se realiza en el CIAM (43° 15' N, 8° 18' O) cerca de la costa, en A Coruña (100 m elevación) en un suelo franco arenoso. Los campos de multiplicación se separan entre sí como mínimo 20 m y se rodean de un cereal de caña alta (mayor de 1,40 m

de altura) como suele ser el trigo gallego o el centeno. La franja de cereal alrededor de cada parcela suele ser de 20 m. Se utilizan bolsas de un tejido de muselina para evitar la dispersión natural de las semillas de las plantas en los campos de multiplicación. De la semilla obtenida, alrededor de 3.000 semillas se envían al Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos del INIA en Alcalá de Henares.

Hasta ahora se han multiplicado por este sistema 157 muestras, siendo 60 del género *Dactylis* y 97 de los géneros *Lolium* y *Festuca*.

4.2.2. Un ciclo de multiplicación en raigrás italiano anual

En el caso de especies alogamas con polinización anemófila no hay mucha información sobre el modo en que se ven afectadas las frecuencias alélicas y los caracteres agromorfológicos de las poblaciones por el modo de multiplicación realizado en los bancos de germoplasma. Balfourier *et al.* (1994) en poblaciones naturales de raigrás inglés (*Lolium perenne* L.) estudiaron como afectaba el método de creación de poblaciones experimentales en la conservación de las frecuencias alélicas y genotípicas utilizando isoenzimas. Johnson (1998) estudió la estructura genética de poblaciones de raigrás italiano multiplicadas de diferentes maneras mediante la técnica de la electroforesis de isoenzimas, pero no realizó un estudio agronómico.

Con el fin de evaluar posibles cambios en la diversidad genética mediante marcadores isoenzimáticos y agromorfológicos en un primer ciclo de multiplicación con recogida en conjunto de las semillas, en variedades locales de raigrás italiano anual, se escogieron cinco variedades locales pertenecientes a dos clases agronómicas creadas mediante la aplicación de métodos multivariados a una caracterización agromorfológica realizada por Oliveira *et al.* (1997b). Cada una de estas poblaciones se recogió en forma de semilla multiplicada por los agricultores en sus campos de cultivo.

Las poblaciones Luarca, Pravia y Prendes pertenecen a la clase agronómica 1, con una fecha de espigado intermedia (finales de marzo a primeros de abril). Las poblaciones Ordenes y Padrón pertenecen a la clase agronómica 2, con una fecha de espigado tardío (segunda quincena de abril).

Las cinco poblaciones originales se multiplicaron individualmente utilizando en total 90-100 plantas por población.

Debido a que el raigrás italiano es una especie alógama y con polinización anemófila, las parcelas de multiplicación se aislaron mediante un cultivo de trigo autóctono gallego de caña alta, separándolas 20 metros de cualquier fuente de polen contaminante (otra parcela de multiplicación, cultivo, población natural, etc.). La semilla se recogió en conjunto en todas las plantas de cada población, no realizando una mezcla equilibrada de la semilla de cada planta.

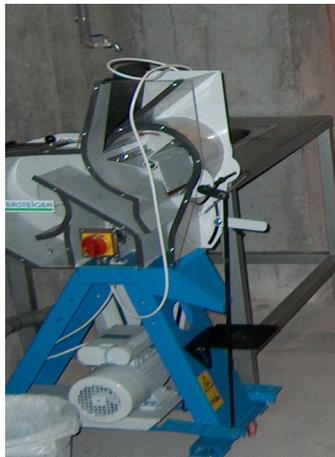


Figura 29 Trilladora de espigas.



Figura 30. Columna densimétrica.

Diseño experimental

El ensayo de campo se realizó en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (43° 15' N, 8° 18' O) en A Coruña, a 100 m de altitud y cercano a la costa. Con el fin de estimar una eventual deriva genética ligada a la fase de multiplicación de las poblaciones originales, se implantaron 5 repeticiones o bloques de 10 plantas por población original y se compararon al mismo número de plantas obtenidas por multiplicación de las poblaciones originales. De esta manera, se instalaron 10 plantas x 5 repeticiones x 10 poblaciones (5 originales + 5 multiplicadas) = 500 plantas en un campo de plantas aisladas, bajo la forma de un diseño en bloques completos al azar.



Figura 31. Plantas aisladas de raigrás italiano anual.

Las plantas individuales se trasplantaron a una distancia de 0,5 m entre líneas y 0,5 m entre plantas. Como abonado de fondo se aplicaron 1000 kg/ha del abono 8-15-15.

Los caracteres observados durante dos años (2000 y 2001) fueron los siguientes: fes, fecha de espigado en nº de días a partir del 1 de enero; crt, crecimiento anual en g de materia seca/planta obtenido al sumar la producción de materia seca de los cortes dados durante el año; alp, altura de la planta medida en cm desde la base de la planta hasta el extremo de la última espiga; ain, abundancia de inflorescencias en nº de espigas/planta después de tres semanas del inicio del espigado; ahb, anchura de la hoja bandera en mm en espigado; lhb, longitud de la hoja bandera en cm desde la lígula hasta el ápice en espigado.

Análisis estadísticos

El efecto multiplicación se evaluó mediante un análisis de varianza a un factor (factor multiplicación con dos modalidades: sin multiplicación y con multiplicación) aplicado de manera independiente a los datos de cada año.

El modelo de análisis de varianza usado para los datos obtenidos en las plantas aisladas fue el siguiente:

$$X_{ijk} = \mu + b_i + M_j + (bxM)_{ij} + E_{ijk}$$

Dónde: X_{ijk} es el valor fenotípico, μ es la media general, b_i es el efecto bloque, M_j es el efecto multiplicación, $(bxM)_{ij}$ es la interacción bloquexMultiplicación y E_{ijk} es el error.

El efecto bloque se consideró aleatorio. Se evaluó la significación del factor multiplicación respecto a la interacción bloquexMultiplicación. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS 11.5 (SPSS, 2002).

Isoenzimas

En las 10 poblaciones (cinco poblaciones originales y cinco multiplicadas) se estudiaron entre 78 y 153 plantas por población mediante la técnica de electroforesis de isoenzimas en gel de almidón según Hayward y McAdam (1977), Ostergaard *et al.* (1985), y Greneche *et al.* (1991). Las isoenzimas son marcadores bioquímicos que identifican las variaciones en proteínas. Se utilizó un tampón histidina/citrato lo que permitió estudiar cinco sistemas enzimáticos, dando cinco loci: ácido fosfatasa (ACP, E.C. 3.1.3.2), peroxidasa (PRX, E.C. 1.11.1.7), fosfogluco-isomerasa (PGI, E.C. 5.3.1.9.), fosfogluco-mutasa (PGM, E.C. 2.7.5.1.) y shikimato deshidrogenasa (SDH, E.C. 1.1.1.25). Los geles se evaluaron etiquetando los alelos en un determinado locus como “a”, “b”, “c”, etc., siendo “a” el alelo más rápido. Cuando se observó un nuevo alelo, se denominó “a⁺” si migra más que el “a” o “c*” si migra menos que el “c” y más que el “d”

Se utilizó la descendencia de una planta de *Lolium temulentum*, como patrón en el estudio electroforético. *Lolium temulentum* es una especie diploide, autógama y autocompatible, siendo homocigota para los loci estudiados.

Las frecuencias alélicas, heterocigosidades observadas y esperadas, número medio de alelos por locus y porcentaje de loci polimórficos se determinaron mediante el programa BIOSYS 1 (Swofford y Sealander, 1981).

Para cada población y cada locus, se calculó el test χ^2 (Snedecor y Cochran, 1967) para comparar las proporciones alélicas de las poblaciones originales con las de las poblaciones multiplicadas. Para un alelo y locus dado, la proporción esperada fue el tamaño de la muestra de la población multiplicada (n° de individuos analizados) por la frecuencia alélica de la población original, y la proporción observada fue el tamaño de la muestra de la población multiplicada por la frecuencia alélica de la población multiplicada. La diferencia entre la proporción observada y la esperada se elevó al cuadrado, se dividió por la proporción esperada y se sumó para todos los alelos de un locus, obteniendo así el valor del χ^2 , considerando como grados de libertad el n° de clases menos uno. Además, se calculó una prueba χ^2 para evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada uno de los loci polimórficos (Hartl y Clark, 1989).

En ninguna de las 12 variables estudiadas dicho efecto resultó significativo al nivel del 5%. Por lo tanto, ninguna de las variables se vio afectada de manera sistemática por el efecto de la multiplicación.

Tabla 10. Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables agromorfológicas; FV: fuente de variación; GL: grados de libertad; fes: fecha de espigado en nº de días a partir del 1 de enero; crt: crecimiento anual en g de materia seca/planta; alp: altura de la planta en cm; ain: abundancia de inflorescencias en nº de espigas/planta después de tres semanas del inicio del espigado; ahb: anchura de hoja bandera en mm de la máxima anchura; lhb: longitud de hoja bandera en cm desde la lígula hasta el ápice. *, **, *: significativo al nivel 5, 1 y 0,1% respectivamente.**

Año 2000				
FV	bloque	Multiplicación	bloquexMultiplicación	Error
GL	4	1	4	399
fes	335,39*	294,39	49,23	211,60
crt	3266,77	113,49	1143,73	1330,17
alp	1577,69	4868,88	805,32	543,26
ain	1120,74	2085,86	2616,51	2012,11
ahb	51,54	51,07	54,62***	10,43
lhb	152,28	124,09	30,81	39,74
Año 2001				
FV	bloque	Multiplicación	bloquexMultiplicación	Error
GL	4	1	4	446
fes	158,70	413,47	18,79	221,89
crt	5674,28	4914,79	14941,56	7129,79
alp	573,28	52,77	464,43	371,78
ain	2774,66	13560,05	5271,80	2538,81
ahb	2,40	2,92	3,83	2,35
lhb	62,41	22,89	25,15	18,90

Tabla 11. Valores medios de las variables agromorfológicas medidas en el ensayo de campo en el año 2000: fes: fecha de espigado en n° de días a partir del 1 de enero; crt: crecimiento anual en g de materia seca/planta; alp: altura de la planta en cm; ain: abundancia de inflorescencias en n° de espigas/planta después de tres semanas del inicio del espigado; ahb: anchura de hoja bandera en mm de la máxima anchura; lhb: longitud de hoja bandera en cm desde la ligula hasta el ápice. Errores estándar entre paréntesis.

	Año 2000					
	fes	crt	alp	ain	ahb	lhb
Originales						
Luarca	101,2 (1,53)	30,2 (10,44)	64,7 (2,38)	77,9 (7,54)	8,0 (0,26)	14,1 (0,78)
Pravia	99,8 (1,48)	32,5 (10,11)	62,2 (2,30)	79,1 (7,30)	7,2 (0,25)	13,4 (0,76)
Prendes	101,9 (1,57)	25,4 (10,76)	61,4 (2,4)	76,7 (7,77)	7,7 (0,27)	15,8 (0,81)
Ordenes	124,7 (1,38)	78,9 (9,44)	104,0 (2,1)	97,7 (6,82)	8,8 (0,24)	20,8 (0,71)
Padrón	128,4 (1,26)	79,7 (8,59)	106,7 (1,96)	112,7 (6,20)	8,9 (0,21)	21,7 (0,64)
Media	113,1 (1,08)	53,0 (2,70)	83,0 (1,73)	91,2 (3,33)	8,2 (0,24)	17,7 (0,47)
Multiplicadas						
Luarca	103,4 (1,34)	25,2 (9,21)	74,5 (2,10)	46,9 (6,65)	7,8 (0,35)	13,1 (0,73)
Pravia	109,1 (1,30)	35,9 (8,88)	74,3 (2,03)	80,3 (6,41)	7,2 (0,33)	13,9 (0,70)
Prendes	103,3 (1,28)	33,3 (8,79)	82,2 (2,00)	65,1 (6,34)	7,7 (0,33)	14,2 (0,70)
Ordenes	131,6 (1,26)	92,5 (8,60)	109,5 (1,96)	127,2 (6,20)	13,3 (0,32)	22,2 (0,68)
Padrón	123,8 (1,22)	65,8 (8,33)	104,8 (1,90)	105,9 (6,01)	8,2 (0,31)	18,7 (0,66)
Media	114,9 (0,97)	51,9 (2,42)	89,9 (1,55)	86,7 (2,98)	8,9 (0,21)	16,6 (0,42)

Tabla 11 (Continuación). Valores medios de las variables agromorfológicas medidas en el ensayo de campo en el año 2001: fes: fecha de espigado en n° de días a partir del 1 de enero; crt: crecimiento anual en g de materia seca/planta; alp: altura de la planta en cm; ain: abundancia de inflorescencias en n° de espigas/planta después de tres semanas del inicio del espigado; ahb: anchura de hoja bandera en mm de la máxima anchura; lhb: longitud de hoja bandera en cm desde la lígula hasta el ápice. Errores estándar entre paréntesis.

	Año 2001					
	fes	crt	alp	ain	ahb	lhb
Originales						
Luarca	100,96 (1,28)	24,5 (8,33)	67,2 (1,84)	58,8 (5,73)	8,5 (0,21)	13,9 (0,62)
Pravia	103,9 (1,31)	35,7 (8,51)	72,9 (1,87)	86,9 (5,85)	7,5 (0,21)	14,2 (0,64)
Prendes	100,1 (1,31)	29,6 (8,51)	70,5 (1,87)	60,2 (5,85)	8,4 (0,21)	14,7 (0,64)
Ordenes	123,4 (1,45)	95,1 (9,84)	97,5 (2,17)	97,9 (6,77)	8,9 (0,25)	18,0 (0,74)
Padrón	128,30 (1,24)	75,9 (8,42)	99,3 (1,86)	103,4 (5,79)	8,4 (0,21)	16,9 (0,63)
Media	110,8 (0,98)	49,4 (5,55)	80,5 (1,27)	80,3 (3,32)	8,3 (0,10)	15,4 (0,29)
Multiplicadas						
Luarca	103,7 (1,31)	25,2 (8,51)	66,6 (1,94)	50,2 (6,14)	7,8 (0,32)	12,8 (0,67)
Pravia	104,1 (1,45)	19,0 (9,21)	63,6 (2,10)	41,2 (6,65)	7,0 (0,35)	13,2 (0,73)
Prendes	103,0 (1,37)	24,3 (8,79)	68,3 (2,03)	53,3 (6,34)	8,2 (0,33)	13,7 (0,70)
Ordenes	121,5 (1,35)	135,8 (8,79)	100,5 (2,00)	91,9 (6,34)	9,6 (0,33)	19,3 (0,70)
Padrón	129,7 (1,32)	73,0 (8,60)	97,9 (1,96)	106,1 (6,20)	7,9 (0,32)	15,5 (0,68)
Media	112,7 (0,99)	55,9 (5,63)	79,9 (1,29)	69,3 (3,36)	8,1 (0,10)	14,9 (0,29)

Análisis isoenzimático

Cada uno de los cinco sistemas enzimáticos reveló un locus polimórfico: PGI-2, PGM-1, ACP-1, PRX-1 y SDH-1.

El patrón *Lolium temulentum* resultó monomórfico y homocigótico con los siguientes alelos fijados: PGI-2a, PGM-1a, ACP-1d, PRX-1d y SDH-1b.

Las frecuencias alélicas de las poblaciones multiplicadas difirieron significativamente de las frecuencias de las poblaciones originales en cuatro de 15 loci polimórficos en las poblaciones de la clase agromorfológica 1 y en cuatro de 10 loci polimórficos en las poblaciones de la clase agromorfológica 2. Se produjo también la pérdida de los siguientes alelos raros (frecuencia < 0,05), según la clasificación de Brown (1978): el alelo “a” del locus

PGI-2 de la población Padrón, el alelo “c*” del locus PGI-2 presente en la población Pravia y el alelo “d” del locus SDH-1 presente en la población Luarca y que desapareció al multiplicarla.

Tabla 12. Frecuencias alélicas en cinco loci, para las poblaciones de la clase agromorfológica 1 (Luarca, Pravia, Prendes) y las mismas poblaciones multiplicadas (Luarcam, Praviam y Prendesm). El valor χ^2 compara la proporción de alelos en las poblaciones originales con los de las poblaciones multiplicadas. *, **, *: significativo al nivel 5, 1 y 0,1% respectivamente.**

Locus	Alelo	Poblaciones					
		Luarca N	Luarcam N	Pravia N	Praviam N	Prendes N	Prendesm N
PGI-2		98	135	111	106	103	109
	A	0,000	0,000	0,005	0,005	0,000	0,000
	B	0,041	0,026	0,068	0,057	0,024	0,032
	C	0,098	0,085	0,072	0,094	0,068	0,087
	D	0,827	0,833	0,779	0,802	0,830	0,849
	E	0,036	0,056	0,059	0,033	0,078	0,032
	A ⁺	0,000	0,000	0,009	0,009	0,000	0,000
	C*	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000
χ^2		7,83		4,44		3,87	
PGM-1		99	139	111	105	103	86
	A	0,778	0,824	0,752	0,619	0,782	0,756
	B	0,222	0,176	0,230	0,333	0,218	0,244
	C	0,000	0,000	0,018	0,048	0,000	0,000
	χ^2		1,71		12,56**		0,33
ACP-1		99	133	114	106	102	109
	A	0,081	0,004	0,039	0,024	0,078	0,060
	B	0,667	0,639	0,667	0,627	0,662	0,583
	C	0,187	0,293	0,259	0,288	0,230	0,344
	D	0,066	0,064	0,035	0,061	0,029	0,014
χ^2		17,89**		3,25		8,49*	
PRX-1		100	102	113	96	100	113
	A	0,060	0,034	0,080	0,083	0,100	0,062
	B	0,555	0,500	0,345	0,427	0,570	0,434
	C	0,385	0,466	0,527	0,484	0,325	0,491
	D	0,000	0,000	0,049	0,005	0,005	0,013
χ^2		3,44		6,00		16,34**	
SDH-1		96	109	78	78	96	84
	A	0,036	0,060	0,045	0,077	0,083	0,113
	B	0,760	0,821	0,821	0,788	0,703	0,673
	C	0,193	0,128	0,119	0,128	0,214	0,214
	D	0,010	0,000	0,006	0,006	0,000	0,000
χ^2		4,67		1,93		1,02	

Tabla 13. Frecuencias alélicas en cinco loci, para las poblaciones de la clase agromorfológica 2 (Ordenes y Padrón) y las mismas poblaciones multiplicadas (Ordenesm y Padrónm). El valor χ^2 compara la proporción de alelos en las poblaciones originales con los de las poblaciones multiplicadas. *, **, *: significativo al nivel 5, 1 y 0,1% respectivamente.**

Locus	Alelo	Poblaciones			
		Ordenes N	Ordenesm N	Padrón N	Padrónm N
PGI-2		140	140	142	143
	a	0,014	0,061	0,039	0,000
	b	0,157	0,186	0,190	0,147
	c	0,211	0,179	0,127	0,059
	d	0,593	0,543	0,609	0,738
	e	0,021	0,021	0,032	0,052
	a ⁺	0,000	0,000	0,004	0,003
	c*	0,004	0,011	0,000	0,000
χ^2			25,92**	12,31	
PGM-1		145	153	142	119
	a	0,810	0,876	0,796	0,702
	b	0,190	0,124	0,204	0,298
	χ^2		4,25*		6,48*
ACP-1		111	136	143	123
	a	0,072	0,059	0,101	0,098
	b	0,649	0,699	0,692	0,691
	c	0,239	0,210	0,196	0,195
	d	0,041	0,033	0,010	0,016
	χ^2		1,53		0,45
PRX-1		107	148	142	147
	a	0,042	0,020	0,035	0,075
	b	0,379	0,345	0,356	0,367
	c	0,579	0,635	0,609	0,558
	χ^2		2,95		7,41*
SDH-1		112	123	110	113
	a	0,125	0,150	0,086	0,080
	b	0,683	0,683	0,655	0,633
	c	0,192	0,167	0,259	0,288
	χ^2		1,02		0,49

El número medio de alelos por locus, el porcentaje de loci polimórficos y las heterocigosidades medias resultaron muy similares en las diferentes poblaciones. Las comparaciones entre las heterocigosidades medias por locus, observadas y esperadas asumiendo la distribución de Hardy-Weinberg (Nei, 1978) mostraron ligeras diferencias a favor de las heterocigosidades esperadas (errores estándar entre paréntesis). Por este motivo, puede haber un ligero déficit de heterocigotos en las poblaciones originales y multiplicadas.

Tabla 14. Resumen de la variabilidad genética en las poblaciones originales y multiplicadas (los errores estándar se dan entre paréntesis), Ho: heterocigosidad observada, Hs: heterocigosidad esperada por Hardy-Weinberg.

Poblaciones	Tamaño medio por locus	Nº medio de alelos por locus	Porcentaje de loci polimórficos	Heterocigosidad media	
				Ho	Hs
Poblaciones originales					
Luarca	98,4 (0,7)	3,4 (0,4)	100	0,355 (0,024)	0,373 (0,046)
Pravia	105,4 (6,9)	4,4 (0,7)	100	0,381 (0,044)	0,432 (0,050)
Prendes	100,8 (1,3)	3,4 (0,4)	100	0,386 (0,031)	0,433 (0,049)
Ordenes	123,0 (8,0)	3,6 (0,7)	100	0,415 (0,060)	0,482 (0,046)
Padrón	135,8 (6,5)	3,6 (0,7)	100	0,329 (0,056)	0,476 (0,041)
Media	112,7 (4,7)	3,7 (0,6)	100	0,359 (0,043)	0,448 (0,046)
Poblaciones multiplicadas					
Luarcam	123,6 (7,5)	3,2 (0,4)	100	0,366 (0,042)	0,387 (0,054)
Praviam	98,2 (5,4)	4,2 (0,5)	100	0,398 (0,045)	0,462 (0,047)
Prendesm	100,2 (6,3)	3,4 (0,4)	100	0,376 (0,035)	0,449 (0,056)
Ordenesm	140,0 (5,2)	3,6 (0,7)	100	0,411 (0,077)	0,457 (0,067)
Padronm	129,0 (6,8)	3,4 (0,5)	100	0,399 (0,054)	0,478 (0,025)
Media	118,2 (6,2)	3,6 (0,5)	100	0,366 (0,051)	0,447 (0,049)

Según los tests χ^2 , la mayoría de los loci no estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg. De los 25 loci polimórficos observados en las poblaciones originales, 12 estuvieron en equilibrio ($p > 0,05$). En el caso de las poblaciones multiplicadas, 11 estuvieron en equilibrio ($p > 0,05$). Debido a que, al no tener equilibrio de Hardy-Weinberg, los cruzamientos no son en panmixia, se pueden esperar cambios en las frecuencias genotípicas de una generación a la siguiente.

Tabla 15. Test χ^2 de equilibrio de Hardy-Weinberg en las poblaciones originales, y multiplicadas para cada uno de los loci. *, **, *: significativo al nivel 5, 1 y 0,1% respectivamente.**

	PGI-2	PGM-1	ACP-1	PRX-1	SDH-1
Poblaciones originales					
Luarca	0,72	0,42	37,78***	6,72*	2,31
Pravia	1,51	4,90*	15,58***	7,99**	13,60***
Prendes	0,98	1,45	2,67	8,66**	0,18
Ordenes	0,05	13,44***	18,35***	1,35	0,23
Padrón	2,19	17,40***	62,21***	21,72***	15,87***
Poblaciones multiplicadas					
Luarcam	0,10	0,16	8,10**	3,58	17,14***
Praviam	0,36	35,33***	0,23	12,60***	5,80*
Prendesm	0,07	8,10**	6,37*	13,06***	14,39***
Ordenesm	2,86	3,85*	34,41***	5,11*	1,22
Padronm	0,26	0,49	81,58***	2,41	3,85*

Una de las decisiones importantes que hay que tomar cuando se va a multiplicar una población es la de decidir el número de individuos a multiplicar. Lawrence *et al.* (1995) recomiendan que al muestrear una población en el campo se mantenga los alelos con frecuencia de 0,05 y superior. Este tipo de alelos son los que Brown (1978) denomina

comunes y son los que se consideran adaptativos y que es necesario mantener en una población. Según Frankel *et al.* (1995), en la conservación de recursos fitogenéticos para la agricultura, el mantenimiento de los alelos (n° medio de alelos/locus) es más importante que el mantenimiento exacto de unas frecuencias alélicas. A pesar de que las frecuencias alélicas en las poblaciones multiplicadas se desviaron de las obtenidas en las poblaciones originales en el 32% de los loci polimórficos y de la pérdida de tres alelos raros, el método de multiplicación empleado con mezcla en conjunto de la semilla no condujo a una pérdida de alelos comunes.

Una consideración más importante quizás, es la pérdida potencial de diversidad asociada con la multiplicación de muestras previamente multiplicadas. Brown *et al.* (1997) mostraron que el muestreo sucesivo en una muestra previa, como se hace en las multiplicaciones de semillas de poblaciones, resulta en un aumento del tamaño de la población en progresión geométrica, para mantener un porcentaje determinado del número total de alelos presentes inicialmente a una frecuencia determinada. Esto haría impracticable la multiplicación de muestras de especies alógamas en los bancos de germoplasma.

Quizás se debería dedicar más esfuerzo en la conservación de alelos raros mediante la recogida de muestras que poseen dichos alelos a frecuencias relativamente altas. Dichas entradas deberían contener alelos que son raros en el pool genético de la especie, pero estarían a frecuencias relativamente altas.

Tanto la heterocigosidad media como el número de alelos por locus representan componentes claves de la diversidad genética (Brown, 1978). Una reducción en la heterocigosidad podría sugerir una pérdida en la diversidad y una posible tendencia hacia la fijación (homocigosis) y a la pérdida de alelos en un locus determinado. En este trabajo no se observó una reducción clara en la heterocigosidad ni en el n° de alelos por locus en las poblaciones multiplicadas.

En el estudio isoenzimático se encontró un déficit de heterocigotos para la mayoría de los loci a excepción del PGI-2 en el que hay una selección a favor de los heterocigotos. Según Fearon *et al.* (1983) esto se explica por la existencia de un sistema de autoincompatibilidad gametofítica de dos loci S y Z multialélicos. Ambos loci están ligados con el locus PGI-2 que situaron conjuntamente en el cromosoma 6. Este déficit puede ser debido al pequeño tamaño

de la unidad panmíctica y al efecto Wahlund, como indican Charmet *et al.* (1993). La población recogida en una parcela determinada puede contener círculos de individuos (vecindarios) que están en media más relacionados genéticamente que dos individuos tomados al azar en la población total. El cruzamiento sería panmíctico sólo dentro de cada vecindario.

Aunque el estudio isoenzimático suministra datos interesantes de cómo los procedimientos de multiplicación afectan a la estructura genética de las poblaciones, la mayoría de los caracteres importantes en los recursos genéticos son agromorfológicos y/o cuantitativos, y los datos isoenzimáticos pueden no predecir cambios genéticos en estos caracteres. Breese y Tyler (1981) observaron una deriva hacia una floración y producción de semillas más precoz por espiga en raigrás inglés (especie perenne) asociada a la multiplicación. En nuestro trabajo, no se encontraron diferencias significativas en la fecha de espigado ni en los otros caracteres agromorfológicos estudiados en el raigrás italiano anual, como también indica Breese (1973), para las especies anuales.

Al nivel de resolución de los marcadores isoenzimáticos, este trabajo mostró que la multiplicación de entradas de raigrás italiano con mezcla en conjunto de las semillas recogidas conduce a pocos cambios en las frecuencias alélicas y a la pérdida de algún alelo raro. No se observó la pérdida de ningún alelo común (frecuencias alélicas mayores del 5%). Sin embargo, los componentes claves de la diversidad, la heterocigosidad y el número medio de alelos por locus se mantuvieron después de un ciclo de multiplicación. Los resultados obtenidos son, sin embargo, limitados por el número reducido de loci evaluados. La utilización de marcadores moleculares basados en ADN, tales como AFLPs, SSRs o Microsatélites, etc., nos debería permitir la obtención de datos más precisos sobre la conservación de la variabilidad genética en estas especies.

5. Mejora genética de gramíneas pratenses

Uno de los medios más eficaces de asegurar un mejor uso de los fertilizantes, de aumentar la estabilidad de la producción y la calidad nutritiva de las praderas, de tener una mayor tolerancia a enfermedades y plagas o de presentar un buen aspecto estético en los céspedes es la identificación y la manipulación de la variabilidad genética de las especies pratenses para el desarrollo de nuevas variedades mediante mejora genética.

El interés de las plantas forrajeras se mide por la producción animal que permiten. En esto intervienen dos componentes: la cantidad de biomasa cosechable y su rendimiento de transformación en producción animal. El momento en que esta biomasa se recoge puede tener tanta importancia como su cantidad.

En general, en el Norte de España, las temperaturas y el período de sequía estival afectan a la producción de materia seca, su distribución a lo largo del año y su persistencia.

El desarrollo de poblaciones de raigrases (inglés e italiano) con una amplia adaptación y tolerancia a estos factores limitantes, así como con una estación de crecimiento amplia, buenas producciones de biomasa y buen valor nutritivo, son objetivos importantes en la mejora genética de estas especies.

5.1. Mejora genética del raigrás inglés

Los objetivos de selección son el crear variedades mejor adaptadas a las condiciones de medio y de utilización de Galicia. Esto significa una menor tolerancia a enfermedades foliares, principalmente las royas. Se busca también una mejor adaptación a las condiciones de crecimiento desfavorables (sequía y calor de verano) y por lo tanto una mayor persistencia acompañada de una producción de materia seca estable en el tiempo y en el espacio.

Para responder a esos objetivos, se aplican criterios de selección a un material genético recogido en Galicia y evaluado en forma de plantas aisladas y/o en parcelas. De esta forma, la tolerancia a las enfermedades foliares se anota en plantas individuales mediante una anotación visual del ataque. Los objetivos de crecimiento en diferentes estaciones se aprecian por criterios

de vigor de las plantas aisladas, pero también mediante medidas de la producción de materia seca en parcelas. El aspecto estival y por lo tanto la tolerancia a la sequía y al calor se aprecia igualmente en parcelas o en plantas aisladas por una anotación visual de 1 a 9, según que las plantas tengan un mal aspecto o por el contrario, verdes y vigorosas. El respigado se aprecia también visualmente por la importancia de la emisión de tallos reproductivos después de un corte en el momento del espigado.

En 1988 se crearon dos poblaciones sintéticas de raigrás inglés, mediante una generación de cruzamiento al azar entre plantas seleccionadas en dos grupos de poblaciones de precocidad diferente. Estas dos poblaciones constaban de 45 familias de medios hermanos cada una. Estas familias y varios cultivares testigos (“Vigor”, “Preferencia”, “Francés”, “Taptoe”, “Reveille”, “Brigantia”) se instalaron en octubre de 1988 en dos localidades de Galicia (Mabegondo en A Coruña y Puebla de Brollón en Lugo). En cada localidad, las familias y los testigos se evaluaron en campos de plantas aisladas (seis repeticiones de cinco plantas por familia) y en parcelas de 2,8 m² (3 repeticiones) (Oliveira, 1992). Las muestras obtenidas en las parcelas se utilizaron en análisis de valor nutritivo mediante la técnica NIRS (espectrofotometría en el infrarrojo cercano), obteniéndose valores para la digestibilidad “*in vitro*” expresados en % sobre materia orgánica digestible, proteína bruta expresada en % sobre materia seca y fibra ácido detergente manifestada en % sobre materia seca.

5.1.1. Métodos “*in vivo*” del valor nutritivo de un forraje

Para disponer de patrones (métodos “*in vivo*”) para la determinación de la digestibilidad “*in vitro*”, se evaluaron los cultivares “Brigantia” de raigrás inglés y “Exalta” de raigrás italiano en el estado inicio del espigado. La cantidad necesaria de forraje se conservó picada en cámara de congelación hasta su evaluación. Se utilizaron 5 carneros castrados, alojados en jaula metabólica, determinando la ingestión y el contenido en materia seca, materia orgánica y energía digestible (Oliveira *et al.*, 2000a).

La alimentación fue *ad libitum* y se tomaron muestras diarias del alimento (una muestra/día), rechazo y heces (una muestra/animal y día) para la determinación de materia seca. Una vez secas y molidas, se mezclaron para obtener una muestra de alimento por período y una muestra de rechazo y heces por animal y período, para análisis químico. El

tiempo de adaptación de los carneros fue de 15 días y la toma de muestras se realizó durante 6 días.

Tabla 16. Principales resultados del análisis químico.

	Raigrás inglés	Raigrás italiano
Digestibilidad de la Energía (%)	70,9	65,5
Digestibilidad “ <i>in vivo</i> ” (%)	70,5	66,8
Materia Seca (%)	18,8	18,5
Materia Orgánica (%)	90,1	90,8
Ingestión de Materia Seca (g /cabeza.día)	51,0	69,2
Fibra Neutro Detergente (%)	50,0	56,2
Fibra Ácido Detergente (%)	29,7	30,9
Carbohidratos Solubles (%)	23,2	12,8
Nitrógeno Total (%)	1,2	1,7
Carbohidratos/Nitrógeno	19,4	7,4

A la vista de estos resultados, se puede decir que las digestibilidades “*in vivo*” son buenas, con valores de fibras y carbohidratos dentro de lo normal. La relación Carbohidratos/Nitrógeno que indica la aptitud de la hierba a ser ensilada, resultó mucho mejor en el raigrás inglés que en el raigrás italiano. Valores de esta relación entre 4 y 8 indican una aptitud media al ensilado de la hierba y valores superiores a 8 una buena aptitud al ensilado.

5.1.2. Ecuaciones de calibración NIRS

Para desarrollar ecuaciones de calibración NIRS para determinar proteína bruta (CP) fibra ácido detergente (ADF), digestibilidad “*in vitro*” de la materia orgánica (DOM) y carbohidratos solubles (WSC) en muestras de raigrás inglés procedentes del programa de mejora genética, se usó el programa NewISI. Para ello se evaluaron agronómicamente 121 familias de raigrás inglés en Mabegondo (La Coruña) y Puebla de Brollón (Lugo) en el período 1994-1997.

Los espectros de 726 muestras (121 familias x 3 repeticiones x 2 localidades) cortadas en junio de 1994 se registraron en un espectrofotómetro PSCO 6250 y un conjunto de 72 espectros se seleccionaron para calibración con el programa NSAS. Las muestras de calibración se analizaron en el laboratorio para determinar CP, ADF, DOM y WSC.

Las mejores ecuaciones de calibración fueron las obtenidas mediante la regresión de mínimos cuadrados parciales modificados de la segunda derivada de los espectros NIRS sobre los valores analíticos para todos los componentes. Los coeficientes de determinación variaron de 0,98 para proteína bruta a 0,75 para la digestibilidad “*in vitro*”. Los errores estándar de calibración (SEC) y validación (SECV) de la proteína bruta y la fibra ácido detergente fueron más bajos que los de los carbohidratos solubles y la digestibilidad “*in vitro*”, probablemente debidos a la mejor repetibilidad de los datos analíticos (Oliveira y Castro, 1994).

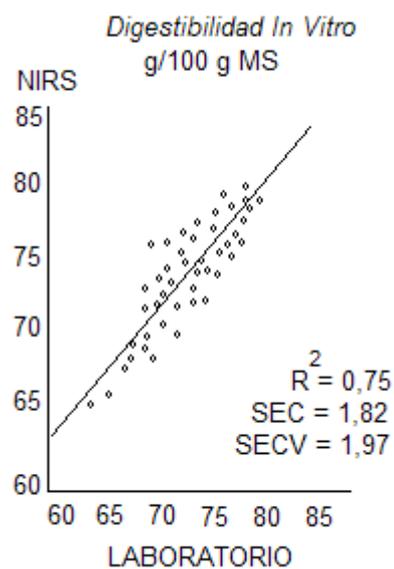


Figura 32. Regresión de datos NIRS sobre datos químicos de laboratorio (Digestibilidad *In Vitro*) para obtener ecuaciones de calibración en raigrás inglés.

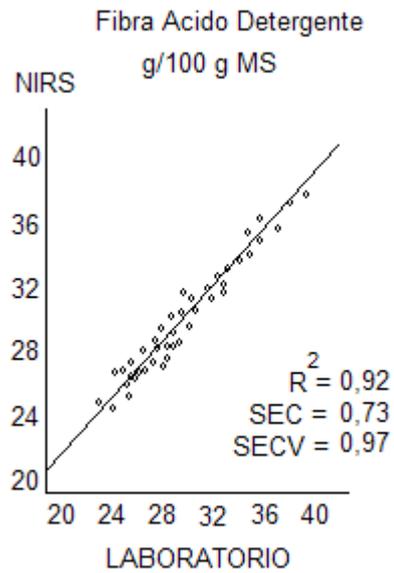


Figura 33. Regresión de datos NIRS sobre datos químicos de laboratorio (Fibra Ácido Detergente) para obtener ecuaciones de calibración en raigrás inglés.

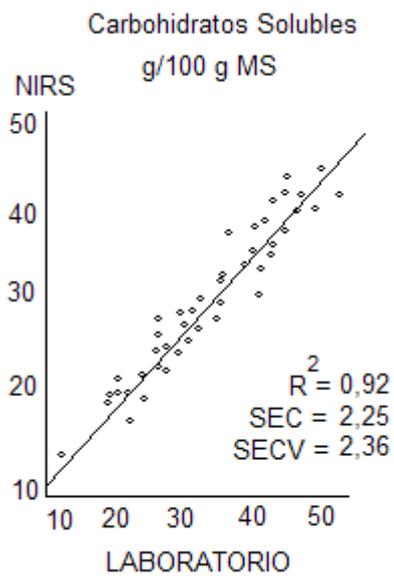


Figura 34. Regresión de datos NIRS sobre datos químicos de laboratorio (Carbohidratos Solubles) para obtener ecuaciones de calibración en raigrás inglés.

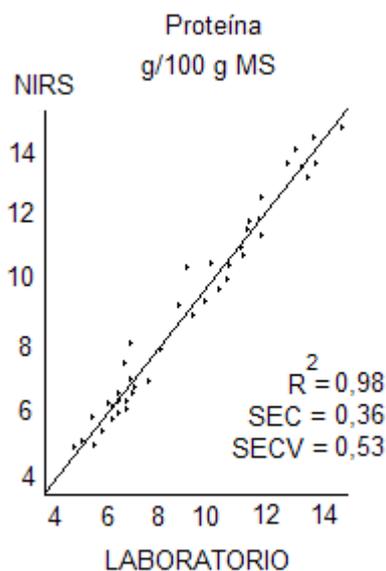


Figura 35. Regresión de datos NIRS sobre datos químicos de laboratorio (Proteína Bruta) para obtener ecuaciones de calibración en raigrás inglés.

Se obtuvieron correlaciones fenotípicas altas para DMO-WSC, DMO-ADF y ADF-WSC, tanto en Mabegondo ($R = 0,97, -0,94$ y $-0,88$) como en Puebla de Brollón ($R = 0,95, -0,94$ y $-0,87$) y estimadas por NIRS.

5.1.3. Primer ciclo de selección en familias

Las descendencias (familias de medio hermanos) del primer ciclo de selección presentan un comportamiento agronómico, similar a las variedades comerciales utilizadas como testigos, en el caso de las características agronómicas anotadas en plantas aisladas (crecimiento en diferentes estaciones, tolerancia a enfermedades, etc.) y la calidad nutritiva (Oliveira, 1992) y ligeramente superior en el caso de los rendimientos estacionales y la persistencia en parcelas densas en el grupo tardío. Las mejores familias presentaron valores superiores en la mayor parte de las características agronómicas interesantes. Sin embargo, no se encontró ninguna familia que presentase todas las características agronómicas favorables.

Los resultados anteriores muestran el interés a corto plazo de la creación de variedades sintéticas mediante selección multicarácter en las mejores familias con una intensidad de selección fuerte. Con este fin se pusieron en un campo de policruzamiento las plantas madre de las mejores familias en el otoño de 1991. Las mejores familias se seleccionaron

independientemente en Mabegondo y en Puebla de Brollón mediante un índice de selección multicarácter.

5.2. Mejora genética del raigrás italiano

Con base en el trabajo de caracterización de 16 variedades locales de raigrás italiano anual de Galicia y Asturias (Oliveira *et al.*, 1997b), se comenzó un programa de selección intrapoblacional en una población de raigrás italiano anual de gran precocidad de espigado. Se realizaron dos ciclos de selección intrapoblacional (uno individual y otro combinando la selección individual y de familias de medio-hermanos). Aunque las cuatro familias seleccionadas fueron menos productivas que los testigos comerciales (Billión, Vitesse, Monasmo y una población experimental de raigrás italiano anual obtenida en el CIAM), su crecimiento de invierno fue mayor, su crecimiento de primavera más precoz y presentaron un mayor contenido de proteína bruta en una de las localidades de evaluación. Se seleccionaron las 25 mejores plantas de cada una de esas familias, con el fin de entrecruzar 100 plantas dentro de un campo de cereal de caña alta y así iniciar la creación de una variedad sintética de raigrás italiano anual adaptada a un sistema de cultivo en rotación con maíz forrajero (Lindner *et al.*, 1997).

5.3. Creación de variedades

Se creó la variedad sintética Ciami formada por 6 genotipos de una población sintética tardía de raigrás inglés. Se incluyó en la Lista de Variedades Comerciales Españolas con fecha de 11 de julio de 2001. La variedad Ciami presenta una mejor distribución estacional de la producción, junto con una fecha de espigado tardía y un porte más erecto que el cultivar Brigantia.

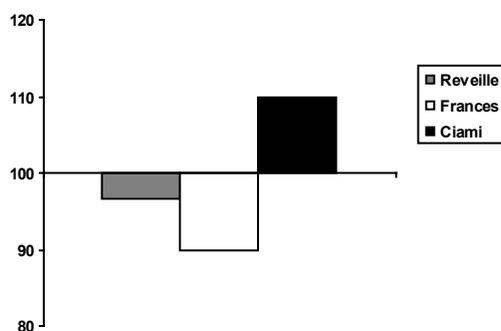


Figura 36. Producción media en dos localidades y tres años del cultivar Ciami respecto al cultivar Brigantia (=100).

Se creó el cultivar comercial Pomba de raigrás italiano anual no alternativa, obtenida por selección fenotípica dentro de una variedad local de raigrás italiano anual de Padrón (A Coruña). Esta variedad está incluida en la Lista de Variedades Comerciales Españolas con fecha de 12 de marzo de 2003 (BOE 25 de marzo de 2003).

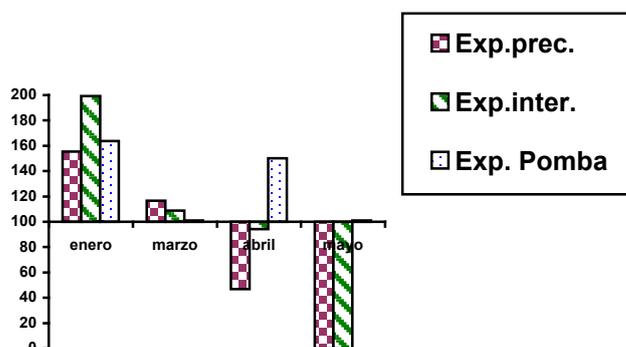


Figura 37. Producción media en Mabegondo del cultivar de raigrás italiano anual Pomba respecto al cultivar Promenade (=100).

Esta variedad presenta un buen crecimiento de invierno-principios de primavera y tiene una fecha de espigado en la tercera decena de abril en el CIAM, siendo más precoz que las variedades Vitesse, Finul, Barspectra y Exalta. Es ligeramente más persistente que Exalta, una de las variedades más persistentes de raigrás italiano.

6. Perspectivas

Hasta ahora la mayor utilización de las colecciones de semillas había sido la obtención de variedades para una agricultura intensiva; en la actualidad hay una necesidad de promover su uso para obtener variedades para una agricultura de bajos insumos (low-input), y para usos alternativos (campos de deporte, de esparcimiento, pastos bajo bosque, etc.), disminuyendo las producciones en línea con lo que el mercado demanda, mejorando las posibilidades de diversificación, y aumentando las posibilidades de utilización de zonas marginales y de valorización del paisaje.

7. Agradecimientos

Los resultados de este trabajo se han podido obtener gracias al apoyo del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (Xunta de Galicia) y de los proyectos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (INIA 9121, INIA SC94-045, INIA 95-017-C2) y del Ministerio de Ciencia y Tecnología (INIA RF99-018-C3).

Al finalizar la elaboración del libro quisiera expresar mi profundo agradecimiento a muchas personas que me han ayudado y estimulado durante estos años de trabajo: Juan Piñeiro, Ernesto y Antonio González, Pilar Castro, Enrique Arbones, Rezar Bregu, Julio López, Luis Costal, Jesús Collar y Carlos Gómez del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, Ruth Lindner y Álvaro García de la Misión Biológica de Galicia y Matías Mayor de la Universidad de Oviedo.

Y por último a mi familia por el apoyo constante y haber soportado con buen humor mis ausencias por el trabajo durante estos años.

8. Bibliografía citada

ANUARIO DE ESTADÍSTICA AGRARIA, 2001. Xunta de Galicia.

ARBONES, E., OLIVEIRA, J. A., 1995. Relaciones entre características agronómicas y factores ecogeográficos en poblaciones naturales de raigrás inglés del Norte de España. *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales*, Vol. 10 (3), 325-340.

BALFOURIER, F., CHARMET, G., GRAND-RAVEL, C., 1994. Conservation of allelic multiplicity and genotypic frequency by pooling wild populations of perennial ryegrass. *Heredity*, 73, 386-396.

BALFOURIER, F., OLIVEIRA, J. A., CHARMET, G., ARBONES, E., 1997. Factorial regression analysis of genotype by environment interaction in ryegrass populations, using both isozyme and climatic data as covariates. *Euphytica*, 98, 37-46.

BARBUJANI, G., 1988. Detecting and comparing the direction of gene frequency gradients. *J. Genet.*, 67, 129-140.

BONY, S., ICEAGA, F., RAYNAL, G., 1996. *Acremonium* toxicosis: a call for collaboration. *Rev. Ned. Vet.*, 147, 403-405.

BREESE, E.L., 1973. Genetic architecture and adaptation in grasses with special reference to *Lolium*. *International Meeting on Quantitative Inheritance, Polymorphisms, Selection and Environment*, 73-81. University of Bologna. Italy.

BREESE, E.L., TYLER, B.F., 1981. Regeneration of germplasm collections of forage grasses and legumes. En: *Seed regeneration in cross-pollinated species*, 45-67. Ed. E. Porceddu y G. Jenquins. A. A. Bulkema, Rotterdam, the Netherlands.

BROWN, A.H.D., 1978. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theoretical and Applied Genetics*, 52, 145-157.

BROWN, A. H. D., 1989. The case for core collections. En: The Use of Plant Genetic Resources, 136-156. Ed. T. Hodgkin, A. H. Brown, O. H. Frankel, T. J. L. Van Hintum, E. A. V. Morales. John Wiley y Sons. Baffins Lane, Chichester, UK.

BROWN, A.H.D., BRUBAKER, C.L., GRACE, P., 1997. Regeneration of germplasm samples. Wild versus cultivated plant species. *Crop Science*, 37: 7-13.

CHARLES, J. P., LEHMANN, J., 1989. Intérêt des melanges de graminées et de légumineuses pour la production fourragère en Suisse. *Fourrages*, 119, 320-331.

CHARMET, G., BALFOURIER, F., RAVEL, C., 1993. Isozyme polymorphism and geographic differentiation in a collection of French perennial ryegrass populations. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 40, 77-89.

CHRISTENSEN, M. J., LEUCHTMANN, A., ROWAN, D. D., TAPPER, B. A., 1993. Taxonomy of *Acremonium* endophytes of tall fescue (*Festuca arundinacea*), meadow fescue (*F. pratensis*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Mycol. Res.*, 97, 1083-1092.

CLAY, K., 1988. Fungal endophytes of grasses. A defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*, 69, 10-16.

COLLET, D., 1991. Modelling binary data. Chapman and Hall, London, England.

DENIS, J. B., 1988. Two-way analysis using covariates. *Statistics*, 19, 123-132.

DÍAZ, N., PIÑEIRO, J., AYUSO, C., 1999. Valor agronómico de variedades comerciales de gramíneas pratenses. CIAM Memoria 1997. Consellería Agricultura, Gandería e Política Agroalimentaria, pp. 49-60. Xunta de Galicia.

ENDLER, J. A., 1977. Geographic variation, speciation, and clines. Princeton University Press, Princeton, N.J., USA.

FEARON, C.H., HAYWARD, M.D., LAWRENCE, M.J., 1983. Self-incompatibility in ryegrass. V. Genetic control in diploid *Lolium multiflorum*. *Heredity*, 50: 35-45.

FERNÁNDEZ DE GOROSTIZA, M., 1996. Semillas de Gramíneas para césped. En: Áreas Verdes, Parques y Jardines. Ediciones Agrotécnicas S.L., pp. 229-288, Madrid.

FLETCHER, L. R., 1999. "Non-toxic" endophytes in ryegrass and their effect on livestock health and production. Proceedings of the New Zealand Grassland Association. Ryegrass endophyte: an essential New Zealand Symbiosis. Grassland Research and Practice series No.7, pp. 133-139. Napier, New Zealand.

FLETCHER, L. R., GARTHWAITE, I., TOWERS, N. R., 1993. Ryegrass staggers in the absence of lolitrem B. Proceedings of the Second International Symposium on *Acremonium*/Grass Interactions, pp. 119-121. Palmerston North, New Zealand.

FRANKEL, O.H., BROWN, A.H.D., BURDON, J.J., 1995. The conservation of plant biodiversity. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

GLENN, A. F., BACON, C. W., PRICE, R., HANLIN, R. T., 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia*, 88, 369-383.

GRENECHE, M., LALLEMAND, J., MICHAUD, O., 1991. Comparison of different enzyme loci as a means of distinguishing ryegrass varieties by electrophoresis. *Seed Science Technology*, 19, 147-158.

GUY, P., GHESQUIERE, M., CHARMET, G., PROSPERI, J. M., 1989. Pooling accessions: advantages and disadvantages. En: Report of a working group on forages, 35-49. (IBPGRI) Montpellier, France.

HAMILTON-MANNS, M., CROTHERS, R., 1999. Farmer experience of perennial ryegrass endophyte on a Manawatu dairy farm. Proceedings of the New Zealand Grassland Association. Ryegrass endophyte: an essential New Zealand Symbiosis. Grassland Research and Practice series No.7, pp. 51-56. Napier, New Zealand.

HAMRICK, J.L., GODT, M. J. W., 1990. Allozyme diversity in plant species. pp. 43-63. In: A.D.H. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler y B.S. Weir (Eds). *Plant Populations Genetics, Breeding and Germplasm Resources*, Massachusetts, Sunderland, USA.

HARTL, D.L., CLARK, A.G., 1989. Principles of population genetics. Ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA.

HAYWARD, M.D., 1985. Adaptation, differentiation and reproductive systems in *Lolium perenne*. In: P. Jacquard, G Hein y J. Antonovics (Eds) Genetic differentiation and dispersal in plants. NATO-ASI Series, Vol. 65, 83-94. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

HAYWARD, M. D., MCADAM, N. J., 1977. Isozyme polymorphism as a measure of distinctiveness and stability in cultivars of *Lolium perenne*. Z. Pflanzenzucht, 79, 59-68.

HOLDER, T. L., WEST, C. P., TURNER, K. E., MCCONNELL, M. E., PIPER, E. L. 1994. Incidence and viability of *Acremonium* endophytes in tall fescue and meadow fescue plant introductions. Crop Science, 34, 252-254.

HUMPHREYS, M. O., 1992. Association of agronomic traits with isozyme loci in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Euphytica, 59, 141-150.

JOHNSON, R.C., 1998. Genetic structure of regeneration populations of annual ryegrass. Crop Science, 38, 851-857.

KIMURA, M., 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

LATCH, G. C. M., 1993. Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance of endophyte-infected grasses. Agric. Ecosystems Environ., 44, 143-156.

LAWRENCE, M.J., MARSHALL, D.F., DAVIES, P., 1995. Genetics of conservation. I. Sample size when collecting germplasm. Euphytica, 84, 89-99.

LEWIS, G. C., 1997. Significance of endophyte toxicosis and current practices in dealing with the problem in Europe. Proc. IV Int. Symp., on *Neotyphodium*/Grass interactions, pp. 28-31. Athens, Georgia, USA.

LEWIS, G. C., RAVEL, C., NAFFAA, W., ASTIER, C., CHARMET, G., 1997. Occurrence of *Acremonium* endophytes in wild populations of *Lolium* spp., in European Countries and a relationship between level of infection and climate in France. *Annals of Applied Biology*, 130, 227-238.

LINDNER, R., GARCÍA, A., 1997. Geographic distribution and genetic resources of *Dactylis* in Galicia (Northwest Spain). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44, 479-487.

LINDNER, R., OLIVEIRA, J.A., GARCIA, A., 1997. Breeding early Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) for rotation with maize in Northwest Spain. *Pastos*, 27 (1), 129-173.

LOOS, B. P., 1994. Morphological variation in Dutch perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations, in relation to environmental factors. *Euphytica*, 74, 97-107.

LÓPEZ, J. E., OLIVEIRA, J. A., 2000. Comparación de procedimientos para elaborar colecciones nucleares en poblaciones españolas de raigrás inglés e italiano. *Pastos*, XXX (1), 71-102.

LÓPEZ, J. E., OLIVEIRA, J. A., 2002. Germoplasma de gramíneas pratenses. *Agricultura*, 837, 224-227.

LUMARET, R., 1984. The role of polyploidy in the adaptative significance of polymorphism at the Got-1 locus in the *Dactylis glomerata* complex. *Heredity*, 52, 153-169.

MAYOR, M., DÍAZ, T. E., 1977. La flora asturiana. Colección Popular Asturiana. Ediciones Ayalga, pp. 710, Salines, Asturias.

NEI, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-50.

NEIL, J. C., 1941. The endophytes of *Lolium* and *Festuca*. *N. Z. J. Sci. Technol.*, 23, 185-193.

NEVO, E., BEILES, A., KRUGMAN, T., 1988. Natural selection of allozyme polymorphisms: A microgeographical differentiation by edaphic, topographical, and temporal factors in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*). *Theor. Appl. Genet.*, 76, 737-752.

NOTT, H. M., LATCH, G. C. M., 1993. A simple method of killing endophyte in ryegrass seed. En: *Proceedings of the Second International Symposium on Acremonium/Grass Interactions*, pp. 14-15. Palmerston North, New Zealand.

OLDEMBURG, E., 1997. Endophytic fungi and alkaloid production in perennial ryegrass in Germany. *Grass and Forage Science*, 52, 425-431.

OLIVEIRA, J. A., 1992. Breeding two base populations of perennial ryegrass. *Euphytica*, 63, 257-263.

OLIVEIRA, J. A., 2000. Collections of forage grasses in northern Spain. En: *Report of a Working Group on Forages (IPGRI). Seventh meeting of the European Cooperative Programme for Crop Genetic Resources Networks (ECP/GR)*. Editores: Maggioni L., Marum P., Sackville Hamilton N.R., Hulden M., y Lipman E., pp. 146-147, 18-20 noviembre. Elvas, Portugal.

OLIVEIRA, J. A., BALFOURIER, F., CHARMET, G., ARBONES, E., 1997a. Isozyme polymorphism in a collection of Spanish and French perennial ryegrass populations. *Agronomie*, 17, 335-342.

OLIVEIRA, J. A., CASTRO, P., 1994. Variability and selection of genotypes of perennial ryegrass for nutritive value using NIRS. *Proceedings 19th EUCARPIA Fodder Crops Section Meeting*, pp. 153-154. Brugge, Belgium.

OLIVEIRA, J. A., CASTRO, V., 1997. Incidence and viability of *Acremonium* endophytes in tall fescue accessions from North Spain. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44, 519-522.

OLIVEIRA, J. A., CASTRO, V., 1998. Incidence of *Neotyphodium* endophytes in Spanish perennial ryegrass (*Lolium perenne*) accessions. *Plant Genetic Resources Newsletter*. Vol 113, 1-3. IPGRI-FAO, Italy.

OLIVEIRA, J. A., COLLAR, J, GONZÁLEZ, A., CASTRO, J., CASTRO, P., LINDNER, R., GARCÍA, A., 2000a. Utilización de germoplasma autóctono para crear variedades de raigrás inglés e italiano adaptadas al Norte de España. Resumen del Informe Final del Proyecto N° SC94-045 del Ministerio de Ciencia y Tecnología terminados en 1997. Tomo II. Producción Animal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, pp. 41-46. Madrid.

OLIVEIRA, J. A., COLLAR, J., GONZÁLEZ, E., LÓPEZ, M., ARBONES, E., 1996. Mejora genética de poblaciones naturales de raigrás inglés y evaluación de la sensibilidad varietal a enfermedades pratenses. Resumen del Informe Final del Proyecto N° 91.21 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación terminado en 1993. Tomo III. Producción Animal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, pp. 67-74. Madrid.

OLIVEIRA, J. A., CHARMET, G., 1988a. Characterization of wild perennial ryegrass populations from Galicia (Spain). *Pastos*, Vol. 18-19 (1-2), 51-68.

OLIVEIRA, J. A., CHARMET, G., 1988b. Polimorfismo isoenzimático de seis poblaciones naturales de raigrás inglés de Galicia. *Pastos*, Vol.18-19 (1-2), 69-85.

OLIVEIRA, J. A., GONZALEZ, A., 2000. Recursos fitogenéticos de raigrás inglés europeos: valor agronómico en condiciones de bajo mantenimiento. *Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetales*. Vol. 15 (1-2), 67-78.

OLIVEIRA, J. A., GONZÁLEZ, E., CASTRO, P., COSTAL, L., 2004. Effects of endophyte infection on dry matter yield, persistence, and nutritive value of perennial ryegrass in Galicia (north-west Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*, Vol. 2, No 4, 558-563.

OLIVEIRA, J. A., LINDNER, R., BREGU, R., GARCÍA, A., GONZÁLEZ, A., 1997b. Genetic diversity of westerwold ryegrass landraces in Northwest Spain. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44, 479-487.

OLIVEIRA, J. A., LÓPEZ, J. E., 1999. Caracterización de poblaciones españolas de *Lolium rigidum* Gaud., para caracteres agromorfológicos e isoenzimáticos. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.*, Vol. 14 (3), 453-463.

OLIVEIRA, J. A., MAYOR, M., GONZÁLEZ, E., 2001. Poas, agrostis y festucas finas. Agricultura, 828, 432-436.

OLIVEIRA, J. A., ROTTINGHAUS, G. E., COLLAR, J., CASTRO, P., 1997c. Perennial ryegrass endophytes in Galicia, Northwest Spain. Journal of Agricultural Science, Vol. 129, 173-177.

OLIVEIRA, J. A., ROTTINGHAUS, G. E., GONZÁLEZ, E., 2003. Ergovaline concentration in perennial ryegrass infected with a lolitrem B-free fungal endophyte in north-west Spain. New Zealand Journal of Agricultural Research, Vol. 46, 117-122.

OLIVEIRA, J. A., ROTTINGHAUS, G. E., PREGO, C., 2000b. Endophytic fungi and alkaloid production in grass seeds in northern Spain. Book of Abstracts of the Grassland Conference 2000 and 4th International *Neotyphodium*/Grass Interactions Symposium, University of Paderborn, p.130. Soest, Germany.

OLIVEIRA, J. A., ROTTINGHAUS, G. E., PREGO, C., GONZALEZ, C., 2002. Contenido en alcaloides en semillas de poblaciones naturales de raigrás inglés del Norte de España infectadas con los hongos endofitos *Neotyphodium*. Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales, Vol. 17 (2), 247-254.

ORTIZ, S., RODRÍGUEZ OUBIÑA, J., 1993. *Dactylis glomerata* subsp. *izcoi*, a new subspecies from Galicia NW Iberian Peninsula. Ann. Bot. Fennici, 30, 305-311.

OSTERGAARD, H., NIELSEN, G., JOHANSEN, H., 1985. Genetic variation in cultivars of diploid ryegrass, *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum*, at five enzyme systems. Theoretical and Applied Genetics 69: 409-421.

PAREDES, J., OLEA, L., VERDASCO, P., 1986. Estudio de variedades de festuca alta para su utilización en praderas de regadío del S.O. de España. Pastos, 16, 151-161.

PIÑEIRO, J., PÉREZ, M., 1986. El interés agronómico de ecotipos españoles de plantas pratenses. Pastos, 44(1), 103-118.

PIÑEIRO, J., PÉREZ, M., 1992. Mezclas pratenses para la España Húmeda. Hoja Divulgadora Núm. 8/92, pp. 47. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

PLAZA, R., GARCÍA, B., GARCÍA, A., VÁZQUEZ, B. R., ZABALGOGEAZCOA, I., 2001. Hongos endofíticos en plantas de *Lolium perenne* L., en dehesas de Salamanca. Actas de la XLI Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos y I Foro Iberoamericano de Pastos, pp. 421-425. Alicante.

PORTAL, R., 1999. Festuca de France. Editorial Robert Portal, pp. 371. Vals-près-Le Puy, France.

RON, A. M. de, SANTALLA, M., BARCALA, N., RODIÑO, A. P., CASQUERO, P. A., MENÉNDEZ, M. C., 1997. *Phaseolus* spp. at the Misión Biológica de Galicia, Spain. Plant Genetics Resources Newsletter, 112, 100.

ROWAN, D. D., SHAW, G. J., 1987. Detection of ergopeptine alkaloids in endophyte-infected perennial ryegrass by tandem mass spectrometry. New Zealand Veterinary Journal, 35, 197-198.

SADEI, 2002. Cuentas Económicas de la Agricultura Asturiana. Servicio de Publicaciones Del Principado de Asturias, pp. 185. Oviedo.

SCHARDL, C. L., 1996. *Epichloë* species: fungal symbionts of grasses. Ann. Rev. Phytopathol., 34, 109-130.

SOKAL, R. R., 1986. Spatial analysis and historical processes. In: Data analysis and Historical Processes (Diday, Escouffier, Lebart, Pages. Sketman y Tomassone, Eds), pp. 29-43. New Holland, Amsterdam, the Netherlands.

SNEDECOR, G. W., COCHRAN, W.G., 1967. Statistical methods. Sixth edition. The Iowa State University Press, Ames, USA.

SPSS, 2002. SPSS para windows versión 11.5. SPSS Inc. 1989-2002.

SWOFFORD, D.L., SELANDER, R.B., 1981. BIOSYS 1: A FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *Journal of Heredity* 72, 281-283.

THOMPSON, F. N., STUEDMANN, J. A., 1993. Pathophysiology of fescue toxicosis. *Agric. Ecosyst. Environm.*, 44, 263-281.

TYLER, B. F., CHORLTON, K. H., THOMAS, I.D., 1984. Characterisation of collected *Lolium perenne* populations. Rep. Welsh Plant Breeding Stn. 1983, pp. 29-32. Aberystwyth, UK.

VALENTINE, S. C., BARTSCH, B. D., CAROLL, P. D., 1993. Production and composition of milk dairy cattle grazing high and low endophyte cultivars of perennial ryegrass. Proceedings of the Second International Symposium on *Acremonium*/Grass Interactions, pp. 138-141. Palmerston North, New Zealand.

WEST, C. P., IZEKOR, E., TURNER, K. E., ELMI, A. A., 1993. Endophyte effects on growth and persistence of tall fescue along a water supply gradient. *Agron. J.*, 85, 264-270.

WHITE, J.F., 1987. Widespread distribution of endophytes in the *Poaceae*. *Plant disease*, 71, 340-342.

WIJSMANN, E. M., CAVALLI-SFORZA, L. L., 1984. Migration and genetic population structure with special reference to humans. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 15, 279-301.